

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号  
特表2003-518379  
(P2003-518379A)

(43) 公表日 平成15年6月10日 (2003.6.10)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	データコード* (参考)
C 12 N	5/06	A 61 L	27/00
A 61 L	27/00		G 2 G 0 4 5
C 12 N	15/09	C 12 Q	1/68
C 12 Q	1/68	G 01 N	21/78
			33/50
			X 4 B 0 6 5
		審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 116 頁)	最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2001-548661(P2001-548661)
(86) (22) 出願日	平成12年12月27日 (2000.12.27)
(85) 翻訳文提出日	平成14年6月25日 (2002.6.25)
(86) 國際出願番号	PCT/US00/35720
(87) 國際公開番号	WO01/048148
(87) 國際公開日	平成13年7月5日 (2001.7.5)
(31) 優先権主張番号	60/173, 350
(32) 優先日	平成11年12月28日 (1999.12.28)
(33) 優先権主張国	米国 (U.S.)
(81) 指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), AU, CA, JP

(71) 出願人 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ ミシガン  
The Regents of the University of Michigan  
アメリカ合衆国 ミシガン 48109-1280,  
アン アーバー, エス. ステイト  
ストリート 3003, ルーム 2071, ウ  
オルベリン タワー  
(74) 代理人 弁理士 山本 秀策 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 哺乳動物の骨のエキソビオ形成のためのプロセスおよびその使用

(57) 【要約】

本発明は、哺乳動物骨の骨のエキソビオ形成のための方法、ならびにその骨のその後の使用に関する。本発明の重要かつ顕著な特徴は、骨細胞スフェロイドの形成を生じる、規定された組織培養条件および因子である。本発明はまた、そのエキソビオ形成された骨を被験体中に移植する方法も提供する。また、骨形成に影響するように骨細胞スフェロイドを遺伝子改変するための方法、骨形成の候補調節因子の同定のための方法、ならびに骨形成に関与する遺伝子の同定のための方法も、記載されている。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 骨をエキソビオで生成するための方法であって、以下の工程

- a) 骨形成原細胞または骨前駆細胞を得る工程；
- b) 1つ以上の骨形成増殖因子の存在下で、無血清条件下で該細胞を培養する工程；および
- c) 骨細胞スフェロイドの形成を可能にする細胞密度で該細胞培養物を維持する工程、

を包含し、それにより、該骨細胞スフェロイド内の細胞により骨が形成される、方法。

【請求項 2】 前記骨形成原細胞または骨前駆細胞がヒト起源である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】 前記骨形成原細胞または骨前駆細胞がウシ起源である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】 前記骨形成原細胞または骨前駆細胞がウマ起源である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】 前記骨形成原細胞または骨前駆細胞がイヌ起源である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】 前記骨形成原細胞または骨前駆細胞がネコ起源である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】 前記骨形成原細胞または骨前駆細胞がマウス起源である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】 前記骨形成原細胞または骨前駆細胞がラット起源である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】 前記骨形成原細胞または骨前駆細胞がニワトリ起源である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】 前記増殖因子が、TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2、TGF- $\beta$ 1、VEGF、インスリン様増殖因子 I もしくはインスリン様増殖因子 I、BMP 2、BMP 4、または BMP 7 である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項11】 前記増殖因子が、副甲状腺ホルモン、カルシトニン、インターロイキン-6、またはインターロイキン-11である、請求項1に記載の方法。

【請求項12】 請求項1に記載の方法であって、物理化学的分離技術によって、前記骨形成原細胞または骨前駆細胞を精製する工程をさらに包含する、方法。

【請求項13】 前記物理化学的分離技術が、平衡密度分離である、請求項12に記載の方法。

【請求項14】 請求項1に記載の方法であって、免疫アフィニティー単離によって、前記骨形成原細胞または骨前駆細胞を精製する工程をさらに包含する、方法。

【請求項15】 前記免疫アフィニティー単離が、免疫接着、免疫カラムクロマトグラフィー、または蛍光細胞分析分離を利用する、請求項14に記載の方法。

【請求項16】 前記免疫アフィニティー単離が、オステオカルシンに対する抗体、オステオネクチンに対する抗体、もしくはアルカリホスファターゼに対する抗体、またはこれらの組み合わせを利用する、請求項14に記載の方法。

【請求項17】 前記培養開始時の前記細胞密度が、約 $1.0 \times 10^3$  細胞/ $\text{cm}^2$ ～約 $1 \times 10^6$  細胞/ $\text{cm}^2$ である、請求項1に記載の方法。

【請求項18】 前記細胞をインビボで移植する工程をさらに包含する、請求項1に記載の方法。

【請求項19】 哺乳動物に骨組織を提供する方法であって、骨細胞スフェロイドを得る工程、および該骨細胞スフェロイドを該哺乳動物中に移植する工程を包含する、方法。

【請求項20】 請求項19に記載の方法であって、前記骨細胞スフェロイドが、1つ以上のアルギネートゲル、コラーゲンゲル、またはフィブリングル中に移植される、方法。

【請求項21】 前記骨細胞スフェロイドが、ポリ乳酸、ポリグリコール酸またはPGLAの1つ以上中に移植される、請求項19に記載の方法。

【請求項22】 前記骨細胞スフェロイドが、ヒドロキシアパタイト化合物、他のアパタイト化合物、失活動物骨、失活ヒト骨、または多孔性セラミック構造物中においてか、またはこれらと関連して、移植される、請求項19に記載の方法。

【請求項23】 前記移植が、股関節インプラント、膝インプラント、もしくは脊椎固定のような、整形外科手術および／または整形外科デバイスと関連して行われる、請求項19に記載の方法。

【請求項24】 前記移植が、口腔外科手術および／または歯科インプラントと関連して行われる、請求項19に記載の方法。

【請求項25】 前記移植が、形成外科手術と関連して行われる、請求項19に記載の方法。

【請求項26】 前記移植が、歯周修復と関連する、請求項19に記載の方法。

【請求項27】 前記移植が、骨形成組織中へである、請求項19に記載の方法。

【請求項28】 前記移植が、創傷へである、請求項19に記載の方法。

【請求項29】 前記哺乳動物が、骨粗鬆症、ビタミンD欠乏症、変形性骨炎、フォン・レックリングハウゼン病のような、骨疾患を有する、請求項19に記載の方法。

【請求項30】 エキソビボで骨を生成するための方法であって、以下の工程：

- a) 骨形成原細胞または骨前駆細胞を得る工程；
- b) 1つ以上の骨形成増殖因子の存在下で、無血清条件下で該細胞を培養する工程；
- c) 骨細胞スフェロイドの形成を可能にする細胞密度で該細胞培養物を維持し、それにより、該骨細胞スフェロイド内の細胞により骨が形成される、工程；ならびに
- d) 該形成された骨細胞スフェロイドから細胞要素を取り出し、そして生じた骨をインビボで使用する工程。

を包含する、方法。

【請求項31】 エキソビボで骨を生成するための方法であって、以下の工程：

- a) 骨形成原細胞または骨前駆細胞を得る工程；
- b) 1つ以上の骨形成増殖因子の存在下で、無血清条件下で該細胞を培養する工程；
- c) 骨細胞スフェロイドの形成を改変するタンパク質の発現を指向する組換えベクターと、該細胞を接触させる工程；
- d) 骨細胞スフェロイドの形成を可能にする細胞密度で該細胞培養を開始する工程、

を包含し、それにより該骨細胞スフェロイド中の細胞によって骨が形成される、方法。

【請求項32】 請求項31に記載の方法であって、前記骨細胞スフェロイド形成を増強する前記タンパク質が、TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2、TGF- $\beta$ 1、2、PTH、カルシトニン、インターロイキン-6もしくはインターロイキン-11、BMP2、BMP4、BMP7、コラーゲン、オステオネクチン、オステオポンチン、骨シアロタンパク質、オステオカルシン、インスリン様増殖因子Iもしくはインスリン様増殖因子II、VEGF、インテグリン $\alpha$ 鎖、インテグリン $\beta$ 鎖、セレクチン、フィブロネクチン、トロンボスponジンまたはカドヘリンである、方法。

【請求項33】 被験体における骨修復のために骨を使用するための方法であって、以下の工程：

- a) 骨形成原細胞または骨前駆細胞を得る工程；
- b) 1つ以上の骨形成増殖因子の存在下で、無血清条件下で該細胞を培養する工程；ならびに
- c) 骨細胞スフェロイドの形成を増強するタンパク質を発現する組換えベクターと、該細胞を接触させる工程；
- d) 骨細胞スフェロイドの形成を可能にする細胞密度で該細胞培養物を維持し、それにより、該骨細胞スフェロイド内の細胞により骨が形成される、工程；

e) 該エキソビオで形成された骨から細胞要素を取り出す工程；ならびに  
f) 該骨を使用して修復をもたらす工程、  
を包含する、方法。

**【請求項34】** 骨形成、骨修復および／または骨疾患に関する遺伝子を同定するための方法であって、以下の工程：

a) 骨形成原細胞または骨前駆細胞を得る工程；  
b) TGF- $\beta$ スーパーファミリーの1つ以上の骨形成増殖因子の存在下で、無血清条件下で該細胞を培養する工程；  
c) 骨細胞スフェロイドの形成を可能にする細胞密度で該細胞培養物を維持する工程、ならびに  
d) 骨細胞スフェロイドの形成の間に過剰発現されるもしくは過小発現され、かつ未処理の骨形成原細胞もしくは未処理の骨前駆細胞中ではそのようには発現されない、遺伝子を同定する工程、  
を包含する、方法。

**【請求項35】** 骨形成、骨修復および／または骨疾患の調節因子を同定するための方法であって、以下の工程：

a) 骨形成原細胞または骨前駆細胞を得る工程；  
b) 1つ以上の骨形成増殖因子の非存在下で、候補調節因子の存在下で、無血清条件下で該細胞を培養する工程；  
c) 骨細胞スフェロイドの形成を測定する工程、ならびに  
d) 該骨細胞スフェロイドの形成を、該調節因子の非存在下で観察される骨細胞スフェロイドの形成と比較する工程、  
を包含する、方法。

**【請求項36】** 1つ以上の骨形成増殖因子の存在下で、骨形成原細胞または骨前駆細胞を培養する工程をさらに包含する、請求項35に記載の方法。

**【請求項37】** 骨形成、骨修復および／または骨疾患の調節因子を生成するための方法であって、以下の工程：

a) 骨形成原細胞または骨前駆細胞を得る工程；  
b) 1つ以上の骨形成増殖因子の存在下で、候補調節因子の存在下で、無血清

条件下で該細胞を培養する工程；

- c) 骨細胞スフェロイドの形成を測定する工程、
  - d) 該骨細胞スフェロイドの形成を、該調節因子の非存在下で観察される骨細胞スフェロイドの形成と比較する工程；ならびに
  - e) そのようにして同定された調節因子を生成する工程、
- を包含する、方法。

- 【請求項38】 a) 骨形成原細胞または骨前駆細胞を得る工程；  
b) 1つ以上の骨形成増殖因子の存在下で、無血清条件下で該細胞を培養する工程；ならびに  
c) 骨細胞スフェロイドの形成を可能にする細胞密度で該細胞培養物を維持し、それにより該骨細胞スフェロイド内の細胞によって骨が形成される工程、  
というプロセスによって生成された、骨細胞スフェロイド。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****(発明の背景)**

米国政府は、National Institutes of Healthからの助成金番号HL59495およびAG43460に従って、本発明において権利を有する。

**【0002】****(1. 本発明の分野)**

本発明は、一般的に生物学および医学の分野に関する。より詳細には、本発明は、エキソビボでの骨形成についてのプロセスおよびその使用に関する。

**【0003】****(2. 関連技術の記載)**

骨のような機能的組織の発達は、多くの微小環境シグナル（サイトカイン／増殖因子、細胞外マトリックス（ECM）分子、および細胞：細胞相互作用）の協調した作用を必要とする。さらに、これらの調節シグナルは、適切な時間的および空間的順序で列をなさねばならず、三次元的増殖を容易にする発達上の微小環境を実現する。骨格系は、このような必要性の例外ではない。TGF- $\beta$ 1ファミリーメンバーのような多くのサイトカイン／増殖因子が骨形成を調節し、そしてオステオネクチン、オステオカルシン、ならびにI型コラーゲンおよびII型コラーゲンなどのようなECM分子が骨形成および軟骨形成の両方において重要なことは十分理解されている。主に二次元であるインビトロの系に対して、骨格およびその胚発達の両方の構造的性質において三次元組織様発達の必要性は絶対的である。しかし、インビトロ系へのこれらのインビボの空間的要求の拡張は、困難であり、そして広く見過ごされてきた。

**【0004】**

細胞凝集、すなわち間葉細胞と上皮細胞との相互作用により媒介される細胞凝集のプロセスは、骨格形成の間の必須の役割を果たす（HallおよびMiyake, 1992; 1995; Stringer, 1997）。発達中のニワトリ胚において、細胞凝集は前軟骨細胞（prechondrocyte）への分化

より先に起こる (Hall および Miyake, 1995)。逆に、骨形成中に細胞は、前骨芽細胞へ分化し、次いで凝集する (Hall および Miyake, 1995; Centrella, 1987)。それにもかかわらず、この凝集は、骨芽細胞の分化およびマトリックスの鉱化より先に起こる (Dunlop および Hall, 1995)。前軟骨細胞の研究で、細胞の凝集は、サイトカインに媒介されるものであり、発達上重要な多くの遺伝子の発現における変化を誘導することが証明された。例えば、TGF- $\beta$ 1 または BMP2 は、どちらも軟骨細胞の凝集を刺激し、かつフィブロネクチン、N-CAM、およびテネイシンを上方制御する (Hall および Miyake, 1995)。間葉の軟骨形成中の細胞凝集という必須の工程は、インビトロの軟骨微小培養で模倣される (Denkerら, 1995)。Tuan および共同研究者は、少量の培地中で高い細胞密度にした (すなわち、微小培養) 多能性 C3H10T1/2 細胞を TGF- $\beta$ 1 処理すると、天然の軟骨性の三次元的構造を形成することを証明した。これらの細胞凝集は、I I 型コラーゲンおよび軟骨結合タンパク質のような、軟骨の細胞外マトリックス成分の上方制御と関連する (Denkerら, 1995)。

同様に、ニワトリ胚 (頭蓋冠 (calvarial) または肢芽) の細胞の研究は、細胞密度が軟骨形成の誘導を媒介することを確かめた (Wong および Tuan, 1995; Woodward および Tuan, 1999)。そして、このプロセスにおける、細胞：細胞相互作用 (おそらく、N-カドヘリン (Woodward および Tuan, 1999) または N-CAM (Oberleender および Tuan, 1994; Miyakeら, 1996) によって媒介される) についての必須の要求性を証明した。

#### 【0005】

今までのところ、組織様の骨形成原細胞の増殖または細胞凝集のインビトロでのモデルは存在しない。頭蓋冠または骨髄由来の骨形成原細胞は、代表的には、二次元 (すなわち、平面の) 表面上で増殖される。最終的に、細胞増殖は、「骨小節 (bone nodules)」への、コンフルエントな細胞の局在化した塊を生じる。これは、細胞密度が骨形成のプロセスにおいて役割を果たすことを示唆する。しかし、細胞密度と骨形成との間の関係を直接的に実証する研究は、

(骨の周囲の細胞外マトリックスの鉱化作用に関する報告とは逆に) 三次元的な結晶性の骨形成を実証する研究と同様に、欠いている。

#### 【0006】

骨欠損を修復するための現行の方法は、生体構造および合成構造の移植を含む。以下の3つの型の生体移植片が一般に使用される：自己移植片、同種移植片、および異種移植片。自己移植片は、患者のある部位から別の部位へ移植される組織である。患者自身の組織を使用する利点は、この移植片が免疫応答を引き起こさないということである。しかし、自己移植を使用するには第2の外科手術部位が必要であり、これは、感染の危険を増大させ、そしてさらなる合併症を誘発し得る。さらに、移植に利用可能な骨は、例えば、腓骨、肋骨および腸骨稜の限定された数の部位に由来する。同種移植片は、同じ種の異なる生体から採取した組織であり、そして、異種移植片は、異なる種の生体から採取した組織である。後者の型の組織は、自己組織片よりも大量に容易に入手可能であるが、ドナーとレシピエントとの間の遺伝的相違は、移植片の拒絶を導き得る。全てに長所および短所があるが、その失われた骨の完全な置換は提供するものはいまだ存在しない。

#### 【0007】

骨の疾患または骨の損傷を罹患している被験体の骨を修復および／または置換するために、より良い方法の必要性が存在する。

#### 【0008】

##### (本発明の要旨)

本発明は、哺乳動物の骨のエキソビオ形成およびそれに続くその骨の使用のための方法に関する。本発明の重大かつ顕著な特徴は、骨細胞スフェロイド (bone cell spheroid) の形成を生じる、規定された組織培養条件および因子である。「骨細胞スフェロイド」とは、骨形成原細胞または骨形成前駆細胞の、組織様の三次元的増殖として定義される。骨細胞スフェロイドの形成は、そのスフェロイド内での骨の形成を可能にする。本発明はまた、エキソビオで形成された骨を被験体に移植する方法を提供する。骨形成に影響するように骨細胞／スフェロイドを遺伝的に変更するための方法、骨形成の候補モジュレータ

ーを同定するための方法、および骨形成に関する遺伝子を同定するための方法もまた記載する。

#### 【0009】

詳細には、本発明は、エキソビボで哺乳動物の骨を生成するための方法に関し、これは、骨形成原細胞または骨前駆細胞を得；一以上の骨形成増殖因子の存在下で無血清条件下でその細胞を培養し；そして、骨を含む骨細胞スフェロイドの形成を可能にする細胞密度でその細胞培養物を樹立することにより、ここで、骨が、その骨細胞スフェロイド内で形成される。本発明中の骨形成原細胞または骨前駆細胞は、骨髓または骨外植片のような一次供給源から単離され得る。このような細胞を単離するためのプロトコールを、本明細書中に記載する。他の実施形態において、骨細胞誘導の細胞系統が使用され得る。骨形成原細胞または骨前駆細胞は、ヒト、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、ニワトリ、ラットまたはマウス起源を含むが、これらに限定されない、いくつかの哺乳動物種に由来し得る。

#### 【0010】

本発明は、規定された無血清培地中での骨形成原細胞の培養を記載する。規定された培地、ならびにこれらの規定された培地に通常見出される添加物（アルブミン、インスリン、鉄供給源、脂肪酸供給源および他の必須成分を含む）を、本明細書中に記載する。本発明の規定された無血清培地にはまた、骨細胞スフェロイドの形成に重要な増殖因子が補充される。一次増殖因子は、トランスフォーミング増殖因子 $\beta$ （TGF- $\beta$ ）遺伝子スーパーファミリーのメンバーとして広く定義される。このファミリーのメンバーとしては、TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2、TGF- $\beta$ 1、2、ならびに骨形成タンパク質2（BMP-2）、BMP-4およびBMP-7が挙げられる。副甲状腺ホルモン（PTH）、カルシトニン、1,25-ジヒドロキシビタミンD3、インターロイキン-6、インスリン様増殖因子（IGF）IおよびII、VEGFおよびインターロイキン-11のような他の増殖因子は、単独のまたは同時刺激の因子として使用され得る。

#### 【0011】

本発明の骨形成原細胞または骨前駆細胞は、平衡密度分離のような物理化学的分離技術によって精製され得る。他の実施形態において、骨形成原細胞または骨

前駆細胞は、例えば、免疫接着、免疫カラムクロマトグラフィー、または蛍光細胞分析分離を利用する免疫アフィニティー単離によって精製され得る。好ましい実施形態において、免疫アフィニティー単離には、オステオカルシンに対する抗体、オステオネクチンに対する抗体、もしくはアルカリホスファターゼに対する抗体、あるいはそれらの組み合わせを利用する。

#### 【0012】

本発明における骨形成または骨前駆細胞の培養は、 $1 \text{ cm}^2$ 当たり約 $1.0 \times 10^3$ 細胞から約 $1 \times 10^6$ 細胞の細胞密度で開始する。

#### 【0013】

本発明のさらなる実施形態は、哺乳動物へ骨組織を提供するための方法を記載し、この方法は、骨細胞スフェロイドを得る工程、およびその骨細胞スフェロイドを哺乳動物へ移植する工程を包含する。この骨細胞スフェロイドは、アルギメントゲル、コラーゲンゲルまたはフィブリンゲルを含む、ゲル中にて移植され得る。他の実施形態において、この骨細胞スフェロイドは、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、またはPGLA中にて移植され得る。この骨細胞スフェロイドはまた、ヒドロキシアパタイト化合物または他のアパタイト化合物、失活動物骨、失活ヒト骨、もしくは他孔性セラミック構造中またはこれらの上にて移植され得る。

#### 【0014】

本発明はまた、股関節インプラント、膝インプラント、および脊椎固定術のような、整形外科手術および／または整形外科的デバイスに関連した、骨細胞スフェロイドの移植にも関する。あるいは、骨細胞スフェロイドの移植は、口腔外科手術および／または歯科インプラント、形成外科手術、または歯周修復に関連する。骨細胞スフェロイドの移植は、骨形成組織中または創傷中になされ得る。骨細胞スフェロイドの移植はまた、骨粗鬆症、ビタミンD欠乏症、骨炎性変形、フオン・リックリングハウゼン病のような骨疾患を有する哺乳動物になされ得る。

#### 【0015】

本発明はまた、骨形成原細胞または骨前駆細胞を得る工程；1以上のTGF- $\beta$ 遺伝子スーパーファミリーの増殖因子存在する無血清条件で細胞を培養する工程；骨細胞スフェロイドおよびその中の骨の形成を可能にする細胞密度で細胞培

養を維持する工程；結果として生じる骨のインビボでの使用を可能にする細胞要素を除去する工程によるエキソビボでの哺乳動物骨の生成のための方法に関する。

#### 【0016】

本発明の別の実施形態は、骨形成原細胞または骨前駆細胞を得る工程；1以上の骨形成増殖因子存在下での無血清条件下で細胞を培養する工程；骨および／または骨細胞スフェロイドの形成を増強するタンパク質の発現を指向する組換cDNAを含むベクターを、上述の細胞と接触させる工程；そして骨細胞スフェロイドの形成を可能にする細胞密度で細胞培養を維持する工程による、エキソビボで哺乳動物の骨を生成するための方法に関する。このベクターは、プラスミドまたはウイルスベクターであり得る。ベクターの作成法および骨形成原細胞または骨前駆細胞への送達法が、記載される。cDNAによって発現され得る、骨細胞スフェロイドの形成を増強するタンパク質は、TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2、TGF- $\beta$ 1.2、BMP-2、BMP-4、およびBMP-7を含むTGF- $\beta$ 遺伝子スーパーファミリーのメンバー、ならびに、オステオネクチン、オステオポンチン、オステオカルシン、骨シアロタンパク質、コラーゲン、フィブロネクチン、トロンボスponジン、インシュリン様増殖因子IもしくはII、またはVEGFのようなcDNAのコードする細胞外マトリックスタンパク質を含むが、これらに限定されない。また、cDNAが指向する、インテグリン、セレクチン、およびカドヘリンのような細胞接着分子の発現、またはPTH、カルシトニン、インターロイキン-6、インターロイキン-11のような増殖因子の発現も意図される。

#### 【0017】

本発明のさらなる実施形態は、骨形成原細胞または骨前駆細胞を得る工程；1以上の骨形成増殖因子存在下での無血清条件下で細胞を培養する工程；骨細胞スフェロイドの形成を増強するタンパク質の発現を指向する組換cDNAを含むベクターを、上述の細胞と接触させる工程；および骨細胞スフェロイドの形成を可能にする細胞密度で細胞培養を開始する工程；エキソビボで形成された骨から細胞要素を除去する工程；および効果的治療のために形成された骨を使用する工程

による、被験体の骨修復のために哺乳動物骨を使用するための方法を記載する。

#### 【0018】

本発明の別の実施形態は、骨形成原細胞または骨前駆細胞を得る工程；1以上  
の骨形成増殖因子存在下で無血清条件下で細胞を培養する工程；骨細胞スフェロ  
イドの形成を可能にする細胞密度で細胞培養を開始する工程；そして骨細胞スフ  
エロイドの形成中または形成後に発現するが、制御された培養条件で培養された  
骨形成原細胞または骨前駆細胞では発現しない遺伝子を同定する工程による、哺  
乳動物の骨形成、骨修復、および／または骨疾患に関与する遺伝子を同定するた  
めの方法に関する。遺伝子を同定するための方法は、差次的メッセージ提示アッ  
セイ、ポリメラーゼ連鎖反応に基づくアッセイ、ノーザン分析、および遺伝子発  
現アレイ（例えば、cDNAまたはオリゴヌクレオチドに基づく遺伝子チップ）  
を含む。

#### 【0019】

本発明はまた、骨形成原細胞または骨前駆細胞を得る工程；候補の調節因子が  
存在するが他の骨形成性増殖因子は存在しない無血清条件下で細胞を培養する工  
程；骨細胞スフェロイドの形成を測定する工程；骨および／または骨細胞スフ  
エロイドの形成を、1以上の骨形成増殖因子の存在下で観察される骨および／また  
は骨細胞スフェロイドの形成と比較する工程による、哺乳動物の骨形成、骨修復  
および／または骨の病気の調節因子を生成するための方法に関する。別の実施形  
態において、本発明は、骨形成原細胞または骨前駆細胞を得る工程；候補調節因  
子が存在し、さらに1以上のTGF- $\beta$ 遺伝子スーパーファミリーの増殖因子が  
存在する無血清条件下で上記の細胞を培養する工程；骨細胞スフェロイドの形成  
を測定する工程；骨細胞スフェロイドの形成を調節因子非存在下で観察される骨  
細胞スフェロイドの形成と比較する工程；およびそのように同定された調節因子  
を生成する工程による、哺乳類の骨形成、骨修復または骨の病気の調節因子を同  
定するための方法に関する。このアッセイによって同定された調節因子は、TGF  
- $\beta$ 遺伝子スーパーファミリーの増殖因子と相乗的に増強し、阻害し、または  
作用すると予測される。現在のところ、結果として生じる微小骨片の大きさを増  
大させるTGFBIおよびPTHによる、スフェロイド形成の共刺激によって、

この後者の概念の最良の例が示されている。

#### 【0020】

本発明はまた、骨形成原細胞または骨前駆細胞を得るプロセス；1以上の骨形成増殖因子の存在下で無血清条件下で上記の細胞を培養するプロセス；そして骨細胞スフェロイドの形成を可能にする細胞密度で細胞培養を維持するプロセスによって作られる骨細胞スフェロイドを記載する。

#### 【0021】

##### (例示的な実施形態の説明)

合衆国における骨折の割合は、一年当たり 6,000,000 人と推定される。骨が完全に骨折すると、有意な数の骨折には、単なる固定（ギブスをする）以上の、医学的介入が必要になる（特に外傷を含む骨折）。このような例における主な問題は、その 2 つの骨末端の近接の欠如（偽関節と呼ばれる）である。これは、不適当かつ長期間の修復プロセスを生じ、このプロセスが回復を妨げ得る。体が骨折を修復するのに要する平均的時間は、中程度の負荷を耐えるには 25～100 日であり、完全な修復には 1 年である。従って、単純な骨折および医学的に複雑な切断の両方が、修復プロセスを加速および／または完遂する新たな治療様式から利益を得る。骨の細化（その主な症状は、頻度の消耗性骨折である）を生じる骨の疾患（骨減少と呼ばれる）、および骨の強度または弾力が損なわれる他の疾患についても、同じことが当てはまる。

#### 【0022】

骨量（種々の増殖促進タンパク質およびビタミン D 3 を含む）の損失についての治療的処置は存在しない。同様に、偽関節骨折または骨の挫滅性の損傷に対する、効果的な置換または移植も存在しない。現在、これらの後者の型の損傷には、拒絶を防ぐために（タンパク質を除去するために）化学的に処理された、ウシ（雌ウシ）またはヒトの死体の骨が使用される。しかし、このような骨の移植片は、力学的には重要であるが、生物学的には死んでいる（これらは、骨形成原細胞、増殖因子、または他の調節タンパク質を含まない）。従って、これらは、この修復プロセスを大きく調節しない。

#### 【0023】

本発明は、哺乳動物の骨のエキソビオでの形成、およびそれに続くその骨を使用するための方法に関する。本発明の必須かつ顕著な特徴は、骨細胞スフェロイドの形成を生じる規定された組織培養条件および因子である。骨形成原細胞または骨前駆細胞の供給源、およびこれらの前駆細胞を単離する方法もまた記載する。本発明はまた、種々の骨の疾患または骨折、切断または他の外傷の処置のために、このエキソビオで形成した骨を被験体に移植する方法を提供する。また、骨形成に影響するように骨細胞スフェロイドを遺伝的に改変する方法、骨形成の候補調節因子の同定、および骨形成に関与する遺伝子の同定のための方法も記載する。

#### 【0024】

##### (I. 骨細胞スフェロイド)

通常の培養条件下では、骨形成原細胞は、種々の量の血清存在下で増殖され、培養皿に接着したままであり、基本的に二次元平面の細胞シートとして増殖する。これらの細胞のインビトロ拡大には、トリプシン処理によるプラスチックからの剥離および再培養が必要である。4～6週間後、これら細胞を、血清ならびにより高いレベルのカルシウムおよびリン酸塩を含む培地に置く。これらの細胞は、コンフルエントな密度に達し、次いで、骨小節と呼ばれる多層の細胞構造を「重層（pile up）」形成する。この構造は、周囲の細胞外マトリックスを鉱化する。

#### 【0025】

はっきりと対照的に、無血清条件下で増殖した骨形成原細胞は、明らかに異なる発達パターンを経て、これは、新規組成の物質の創造を生じる。このプロセスには、TGF- $\beta$  または他の骨形成増殖因子の存在が必要であり、これは、培養初期の0時間～48時間以内に添加される。これらの条件下で、細胞は、さらに24時間～36時間の間でプラスチック接着性になり、組織培養皿のプラスチック表面から自然に剥離し、「骨細胞スフェロイド」と命名した、非接着性の大きさ不定の三次元の球状形態の細胞凝集体を形成する。このスフェロイド内部の骨細胞は、その組織様三次元的発達に起因して、生化学的变化を生じる細胞分化を受け、これらの变化がそのスフェロイドの迅速な（3～7日）鉱化、および（微

小骨片と称する) 結晶骨様構造の形成を導く。本明細書中に記載した、この(微小骨片を含む細胞スフェロイドの) 物質の組成は、明らかに、通常の骨細胞培養物とは異なる。第一に、このプロセスは、骨細胞の球状の三次元的な組織様の発達を生じる。第二に、これらの組織様凝集体は非接着性であり、互いにのみ接着性であるだけであってその下にある培養皿のプラスチックには接着性でない、その細胞の懸濁液中で発達する。最後に、骨細胞の組織様の発達は、無血清条件を必要とし、組織凝集体内での三次元の結晶性の骨のエキソビオ形成を生じる(いかなる他の培養系でも観察または記載されないプロセス)。

#### 【0026】

##### (I I . 骨形成前駆細胞)

本発明は、骨形成原細胞、骨前駆細胞、ならびに骨細胞株からの骨のエキソビオ形成を記載する。以下の節は、これらの前駆細胞の種々の供給源、それらの単離および特徴付けを記載する。骨形成原細胞または前駆細胞は、骨髄または骨のような一次供給源から誘導される。さらに、細胞は、いくつかの異なる種(ヒト、ウシ、ウマ、イヌ、ネコおよびマウス起源の細胞を含む)から誘導され得る。

#### 【0027】

##### (A. 骨前駆細胞)

ヒト骨前駆細胞は、少量の骨タンパク質(オステオカルシン、オステオネクチンおよびアルカリホスファターゼ)を発現し、そして内部の複雑さの程度が低い、小さな大きさの細胞として特徴付けられる(Longら, 1995)。刺激されて分化する場合、これらの前骨芽細胞様細胞は、その外観、大きさ、抗原発現および内部構造が骨芽細胞様になる。これらの細胞は通常非常に低い頻度で骨髄中に存在するが、これらの細胞を単離するためのプロセスは記載されている(Longら, 1995)。米国特許第5, 972, 703号(「Bone Precursor Cells: Compositions and Methods」との発明の名称、Michael W. LongおよびKenneth G. Mann)は、骨前駆細胞を単離する方法および使用する方法をさらに記載し、そして特に本明細書中に参考として援用される。

#### 【0028】

骨前駆細胞を単離するための技術の一例は、以下の工程を包含する。単核細胞を、*f i c o l l* または当業者に公知の他の適切な平衡密度分離技術での分離によって骨髄から調製する。次いで、低密度単核細胞を一晩培養によって培養してプラスチックに付着する細胞を除去する。免疫アフィニティー単離を用いた富化工程は、以前 (Longら, 1995) に記載されたとおりにプラスチック上に固定された抗オステオネクチン (ON) 抗体および抗オステオカルシン (OC) 抗体を用いた非付着低密度細胞の収集を含む。免疫付着細胞は、トリプシン処理によって収集された。代替的な富化工程は、免疫カラムクロマトグラフィーまたは蛍光活性化細胞選別を含み得る。オステオネクチンに対する抗体およびオステオカルシンに対する抗体に加えて、アルカリホスファターゼまたは骨前駆細胞上に発現される他の細胞表面マーカーに対する抗体が利用され得る。これらは、以下の節においてさらに詳細に記載される。

#### 【0029】

本明細書中で使用される場合、骨前駆細胞は、骨芽細胞へと分化または増大し得る任意の細胞である。本発明の骨前駆細胞は、造血性ではなく、従って、汎造血抗原 CD34 を発現しない。好ましい骨前駆細胞としては、前骨芽細胞 (*osteoprogenitor cell*) および前骨芽細胞 (*preosteoblast cell*) が挙げられる。

#### 【0030】

骨前駆細胞は、骨髄細胞の平衡密度遠心分離によってさらに富化され得る。骨髄細胞の平衡密度遠心分離は、骨前駆細胞中に富化された低密度骨髄細胞を提供する。1つの実施形態では、平衡密度遠心分離は、抗体精製の前に行われ得る。第2の実施形態では、平衡密度遠心分離は、抗体精製の後に行われ得る。あるいは、平衡密度遠心分離精製工程は、抗体精製工程の前および後の2回行われ得る。

#### 【0031】

別の局面では、骨前駆細胞集団は、骨髄細胞中に存在する間質細胞を除去することによって富化され得る。間質細胞の除去は、骨髄細胞を付着表面（代表的には、組織培養プラスチックまたはガラス）に暴露することによって達成され得る。

。間質細胞は、組織培養プラスチックまたはガラスに付着し、一方、骨前駆細胞は付着しない。間質細胞は、免疫精製工程の前または後に除去され得る。好ましくは、間質細胞は、免疫精製工程の前に除去される。組織培養プラスチックまたはガラスのような固体表面の使用は当該分野で周知である。組織培養プラスチックおよびガラスは、処理（例えば、シリコーン、ニトロセルロース、ニッケルなど）されて細胞付着が促進または阻害され得る。処理された表面および未処理の表面は市販される。

#### 【0032】

別の局面では、骨前駆細胞の富化された集団は、大きさによってさらに分画される。好ましい実施形態では、大きさの分画は、蛍光活性化フローサイトメトリーによって達成され得る。本発明の骨前駆細胞は、約8ミクロンと約70ミクロンとの間の平均直径を有する。好ましくは、骨前駆細胞は、約10ミクロンと約20ミクロンとの間の平均直径を有する。

#### 【0033】

##### (B. 初代ヒト骨芽細胞)

本発明において使用するための骨細胞の別の供給源は、初代骨芽細胞である。これらの細胞についての単離手順の一例は、RobeyおよびTermaine (1985) に見出され得る。手短には、整形外科手術の間に骨の破片を得る。これらをCollagenase Dで2時間、37°Cで処理し、非付着細胞を洗浄除去し、骨小片を切り刻み、そしてCa<sup>2+</sup>を含まず、10% FCSおよびPen/Strepを含む培地中で培養する。培養物がコンフルエントになった後、トリプシン処理によって細胞を収集し、そしてCa<sup>2+</sup>を含有するDME M中で2～3週間にわたって培養する。骨に由来する骨芽細胞をトリプシン処理によって回収する。

#### 【0034】

骨から骨芽細胞を単離するための代替方法は当該分野で公知である（例えば、Aubinら, 1982を参照のこと）。報告されているように、頭蓋冠を切り出し、培地中でリソスし、そして鉗で切り刻む。切り刻まれた骨をコラゲナーゼで短時間、培地中で消化する。遠心分離し、そして上清をデカントすることによ

つてこの細胞を取り出し、骨の小片を後に残す。ウシ胎児血清を添加してコラゲナーゼ消化を阻害する。細胞を適切な増殖培地中に低密度でプレーティングし、そしてクローン細胞のコロニーを連続培養および特徴付けのために重複して培養する。

## 【0035】

## (C. 細胞株)

上記の初代骨芽細胞および骨前駆細胞に加えて、種々の細胞株が、本発明における方法によって記載される通りにエキソビボ骨球形成のための出発点として用いられ得る。細胞株は、ヒト、ウシ、ウマ、イヌ、ネコおよびマウス起源を含む、多数の種由来であり得る。本発明において含まれる実施例に記載されるような例示的な細胞株は、MG-63細胞(ATCC番号CRL-1427)、C3/H10T1/2細胞(ATCC番号CCL-226)およびSAOS-2細胞(ATCC番号HTB-85)である。他の細胞株もまた、American Type Culture Collectionを通じて利用可能であり、以下が挙げられる：HOS細胞(ATCC番号CRL-1543)およびその種々の誘導物、G-292(ATCC番号CRL-1423)、SJS-1細胞(ATCC番号CRL-2098)、Hs-3.T細胞(ATCC番号CRL-7005)、TE-415.T細胞(ATCC番号CRL-7764)、TE-418.T細胞(ATCC番号CRL-7766)、Hs-755(A).T細胞(ATCC番号CRL-7877)、143B細胞(ATCC番号CRL-8303)、U-2 OS細胞(ATCC番号HTB-96)およびT1-73細胞(ATCC番号CRL-7943)。これらの細胞株は全てヒト骨肉種に由来する。いくつかの他の種に由来する同様の骨肉腫細胞株はATCCから入手可能である。

## 【0036】

## (III. 細胞マーカー)

種々の細胞マーカーを用いて、本発明の骨形成前駆細胞を規定および／または精製する。以下の節は、これらのマーカーおよびそれらの用途を規定する。

## 【0037】

骨前駆細胞（例えば、その全体が本明細書中に参考として援用される、米国特許第5,972,703号に記載される骨前駆細胞）は、骨前駆細胞抗体と免疫反応性である。骨前駆細胞抗体を用いて、骨前駆細胞の集団を富化する。骨前駆細胞抗体としては、抗オステオカルシン、抗オステオネクチンおよび抗骨アルカリホスファターゼが挙げられる。抗オステオカルシン、抗オステオネクチンおよび抗骨アルカリホスファターゼは、Shullら, 1984に記載された。骨前駆細胞はさらに特徴付けられるので、骨前駆細胞と免疫反応する他の抗体は、当業者によって生成され得る。骨前駆細胞と免疫反応性のこれらの他の抗体の使用もまた意図される。好ましい実施形態では、骨前駆細胞抗体は、固体基材に対して結合体化される。固体基材は好ましくは組織培養皿またはペトリ皿である。組織培養プラスチックまたはガラスのような固体表面の使用は当該分野で周知である。組織培養プラスチックおよびガラスは、タンパク質付着を促進または阻害するため処理（例えば、シリコーン、ニトロセルロース、ニッケルなど）され得る。処理された表面または未処理の表面は、市販される。抗体でコーティングした組織培養皿は、骨前駆細胞について「パニング」するために利用され得る。手短には、骨前駆細胞を含む骨髄細胞は、抗体でコーティングした皿の上でインキュベートされる。骨前駆細胞はこの抗体に付着し、一方、全ての他の細胞はこの皿には付着しない。インキュベーション後、この皿を培地で穏やかに洗浄することによって、この皿に付着しない細胞を除去する。骨前駆細胞をこの皿から取り出し、そしてさらに分析するか、精製するかまたは骨芽細胞へと分化させた。

#### 【0038】

別の実施形態では、骨前駆細胞抗体と免疫反応性の第2の抗体を用いて、骨前駆細胞の集団を富化し得る。二次抗体の使用は、当該分野で一般に公知である。代表的に、二次抗体は、第1の抗体の定常領域と免疫反応性の抗体である。好ましい二次抗体としては、抗ウサギ、抗マウス、抗ラット、抗ヤギおよび抗ウマが挙げられ、そして市販される。好ましい実施形態では、二次抗体は、固体基材（組織培養皿、アガロース、ポリアクリルアミドおよび磁性粒子を含む）に結合体化される。この実施形態では、骨前駆細胞抗体は、骨前駆細胞に対して最初に免疫反応性である。抗体が付着した骨前駆細胞は次いで、固体基材に結合体化され

た二次抗体に対して暴露される。前駆細胞の富化が達成される。なぜなら、骨前駆細胞抗体を提示する細胞のみが二次抗体と免疫反応するからである。市販のキットは、磁性粒子に結合体化された二次抗体を提供する。この系では、骨前駆細胞抗体を提示する骨前駆細胞が、磁界への暴露によって精製される。

#### 【0039】

骨抗体（すなわち、オステオカルシンに対する骨抗体、オステオカルシンに対する骨抗体およびアルカリホスファターゼに対する骨抗体）の調製は、本明細書中に参考として援用される Shullら, 1989 に報告された。ポリクローナル抗アボート抗体およびモノクローナル抗体は両方とも、本発明によって意図される。抗体を調製および特徴付けするための手段は当該分野で周知である（例えば、E. Harlow および D. Lane, 1988 を参照のこと）。

#### 【0040】

骨形成系列の正常細胞上の細胞表面抗原は、鳥類種およびげっ歯動物種について報告された（Bruder および Caplan, 1989; 1990; Tursenら, 1992）。報告されたこれらの抗体のいくつかはまた、骨において見出される細胞以外の細胞と反応する。モノクローナル抗体は、正常なヒト骨芽細胞中の細胞内抗原に対して、および形質転換されたヒト骨形成原細胞株の表面に対して惹起されている（Embletonら, 1981; Hosoiら, 1982; Heinerら, 1987; Brulandら, 1988; Tsaiら, 1990; Walshら, 1994）。骨形成原細胞マーカー、抗体およびハイブリドーマの生成、ならびにこれらのマーカーの使用方法の例は、米国特許第5,643,736号に記載されている。ヒト骨形成原細胞を同定し得る、細胞表面エピトープに対するモノクローナル抗体の例は、アルカリホスファターゼに対するモノクローナル抗体である（Lawsonら, 1985）。この十分に特徴付けられた細胞表面酵素は、骨形成原細胞の大きなファミリーを同定するための歴史的（historical）標準として役立っており、そして簡便な組織化学的染色によって容易に実証される。

#### 【0041】

他の好ましい抗原としては、オステオカルシンおよびオステオネクチンが挙げ

られる。オステオカルシンは、骨グラタンパク質（BGP）とも呼ばれる、ビタミンK依存性骨カルシウム結合タンパク質である。特に、ヒトオステオカルシンは、49アミノ酸から構成され、そして5800の分子量を有する、比較的小さなタンパク質である。このタンパク質は、骨芽細胞から生成され、そして骨の非コラーゲンタンパク質の構成成分の約20%を占める。このタンパク質は、 $\gamma$ カルボキシグルタミン酸残基を含み、そしてヒドロキシアパタイトに対して強い親和性を有し、それゆえ、骨マトリックスの形成において重要な役割を有すると推定される。オステオネクチンは、BM40またはSPARC（酸性でシステインに富む分泌タンパク質）とも呼ばれ、組織鉱化、細胞一細胞外マトリックス相互作用、ならびに新脈管形成に関与する多機能性糖タンパク質である。発達中の骨の非コラーゲン性カルシウム結合糖タンパク質。これは、コラーゲンを骨マトリックス中の鉱物に連結する。

#### 【0042】

前駆細胞に対するモノクローナル抗体は、従来の方法によって適切な放射性標識、酵素的標識、蛍光標識もしくは他の標識で標識され得るか、および／または適切な固体キャリア（これは、当業者に明らかである）に結合され得る。例えば、モノクローナル抗体は、免疫化学物質（例えば、フルオレセインイソチオシアネート、ペルオキシダーゼ、ビオチンおよびそのアナログ（例えば、イミノビオチン）、アビジンおよびそのアナログ（ストレプトアビジン）またはこのような他のマーカー）と組合わせて、または免疫化学物質にカップリングされて、用いられ得る。さらに、モノクローナル抗体は、特定の基材に結合または付着され、そして組織サンプル（例えば、骨細胞単離物、骨膜生検または培養細胞）を、この付着されたモノクローナル抗体と接触させる場合、骨形成原細胞を捕獲するために利用され得る。次いで、結合した細胞は、固相および抗体の性質に本質的に依存して、公知の方法によって固相から分離され得る。結合した細胞は回収され得、そして種々の外部因子および内部因子に依存して、骨の再生などの種々の治療目的のために用いられ得る。

#### 【0043】

その結果、本発明は、正常な骨形成原細胞サブセットを他の細胞（例えば、線

維芽細胞または造血細胞) から分離するためにモノクローナル抗体を用いる任意の方法を意図する。例えば、本発明のさらなる実施形態は、正常なヒト骨形成原細胞サブセットの集団を生成する方法に関し、この方法は、以下の工程を包含する：このような細胞を含む組織の細胞懸濁物を提供する工程；この細胞懸濁物を、骨形成原細胞上のエピトープを認識するが線維芽細胞上のエピトープも造血細胞上のエピトープも認識しないモノクローナル抗体と接触させる工程；ならびにこの細胞懸濁物から、このモノクローナル抗体によって結合された細胞を分離および回収する工程。

## 【0044】

(I V. TGF- $\beta$  遺伝子スーパーファミリー)

骨をエキソビオで生成するためのTGF- $\beta$  遺伝子スーパーファミリー由来の増殖因子の使用は、本発明の重要な局面である。以下の節は、TGF- $\beta$  遺伝子スーパーファミリーの特性を詳述する。特に有用なのは、上記の節で規定した骨細胞スフェロイドの形成を誘導する増殖因子である。

## 【0045】

トランスフォーミング増殖因子- $\beta$  スーパーファミリーは、細胞増殖および種々の組織への細胞分化に関する、十分に特徴付けられたファミリーのタンパク質である。TGF- $\beta$  スーパーファミリーのメンバーは一般に、構造が二量体であり、より大きな前駆タンパク質からタンパク質分解切断によって生成される2つの単量体単位を含み、このうちのプロセシングされた単量体はカルボキシル末端部分を表す。この二量体TGF- $\beta$  タンパク質は一般に、約20,000~35,000の分子量を有し、そして成熟タンパク質領域において共通のシステインパターンを共有する。例えば、Sporri (1986) およびその中に引用される論文を参照のこと。TGF- $\beta$  スーパーファミリーとしては、TGF- $\beta$  1~TGF- $\beta$  5以外にいくつかのサブグループが挙げられる。これらは、骨形成タンパク質(BMP)、増殖および分化因子(GDF)、インヒビン、ならびにGDNFおよびミューラー阻害物質ならびに構造的に関連した他のタンパク質である。TGF- $\beta$  スーパーファミリーもまた、特徴付けられており、そして哺乳動物TGF- $\beta$  と比較して高度に保存されている、他の種由来のタンパク質を

含む (Vg1 (*Xenopus*)、(Weeks および Melton, 1987) ; Dpp, Screw および 60A (*Drosophila*)、(Padgett, 1987; Doctorら, 1992); およびより最近同定されたタンパク質 (*Univin* (ウニ)、*Dorsalin-1* (ニワトリ) および *Radar* (*Zebrafish*) を含む) を含む)。この組成物において有効に用いられ得る他の因子としては、TGF- $\beta$  レセプター分子に結合し得る、TGF- $\beta$  スーパーファミリーのメンバーの合成分子またはフラグメントが挙げられる。

#### 【0046】

トランスフォーミング増殖因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) ファミリーのタンパク質は、関連しているが、機能的に異なる、多数のタンパク質からなる (Barnard, 1990; Roberts および Sporn, 1990)。TGF- $\beta$  ファミリーのタンパク質の1つのメンバーである TGF- $\beta$  1 は、増殖促進活性および増殖阻害活性の両方を有する多機能性サイトカインである。近年、TGF- $\beta$  1 は、再狭窄損傷 (Nikolai, 1992) およびアテローム性動脈硬化斑 (Kojima, 1991) のような脈管損傷の修復調節において役割を果たすことが見出されている。

#### 【0047】

TGF- $\beta$  ファミリーのタンパク質のメンバーは、I型 (T $\beta$ RI) および II 型 (T $\beta$ RII) セリン/トレオニンキナーゼレセプターのヘテロマーレセプター複合体に結合することによって、細胞シグナル伝達を開始する (Massague, 1994; Miyazono, 1994 によって概説される)。このヘテロマーレセプター複合体の活性化は、TGF- $\beta$  が T $\beta$ RII に結合したときに生じ、次いで T $\beta$ RII は補充され、そして T $\beta$ RI をリン酸化する。次いで、活性化された T $\beta$ RI はシグナルを、下流の標的へと增幅する (Chen および Weinberg, 1995; Wrana, 1994)。

#### 【0048】

現在までに、TGF- $\beta$  1、TGF- $\beta$  2 および TGF- $\beta$  3 (これらは、機能的に密接に関連しており、高度のレセプター交差反応性を共有する) と命名さ

れる3つの別個の型のTGF- $\beta$ がクローニングされており、そして配列分析によって特徴付けられる。全てのTGF- $\beta$ は、390~412アミノ酸前駆体として合成され、この前駆体は、タンパク質分解切断されて単量体形態を生じ、この単量体形態は、C末端の112アミノ酸からなる。これらの成熟した生物学的に活性な形態であるTGF- $\beta$ は、各々112アミノ酸の2つのポリペプチド鎖の酸安定性および熱安定性ジスルフィド結合ホモ二量体である。ヒトTGF- $\beta$ 1 (Derijckら, 1985)、マウスTGF- $\beta$ 1 (Derijckら, 1986) およびサルTGF- $\beta$ 1 (Sharplesら, 1987) の完全アミノ酸配列は、顕著な配列保存を示し、1アミノ酸残基でのみ異なる。ヒトTGF- $\beta$ 1、ヒトTGF- $\beta$ 2 (de Martinら, 1987; Marquardtら, 1987) およびヒトTGF- $\beta$ 3 (Ten Dijkeら, 1988) のアミノ酸配列の比較は、これらの3つのタンパク質が、成熟形態において約70~80%の配列同一性を示すことを実証した。ヘテロ二量体TGF- $\beta$ 1・2は、ブタ血小板から単離されており、そしてTGF- $\beta$ 2の1つのサブユニットにジスルフィド結合したTGF- $\beta$ 1の1つのサブユニットからなる (Cheniffetzら, 1987)。

#### 【0049】

骨および他の組織の抽出物中に存在する、骨、軟骨、腱および他の組織の形成を担う分子の探索によって、骨形成タンパク質 (BMP) (これは、TGF- $\beta$ 遺伝子ファミリーのメンバーでもある) と呼ばれる、新規なセットの分子の発見がもたらされた。BMP-1~BMP-15と命名されたいくつかのタンパク質の構造は、以前に解明されている。骨、軟骨および/または他の生体組織におけるその存在と共に、これらのタンパク質の独特的な誘導活性は、これらが骨および他の組織の修復プロセスの重要な調節因子であり、そして組織の形成、維持および修復に関与し得ることを示唆する。このような組織の形成、維持および修復のための改善された方法および組成物を同定する必要性がある。

#### 【0050】

骨形成タンパク質ファミリーのメンバーは、軟骨および骨の形成の誘導のために有用であることが示されている。例えば、BMP-2は、新たな軟骨および/

または骨組織の形成を、ラットの異所移植モデルにおいて（米国特許第5, 013, 649号を参照のこと）；イヌにおける下顎欠損において（Toriuら, 1991）；ヒツジにおける大腿分節性欠損において（Gerhardtら, 1991）インビボで誘導し得ることが示されている。BMP-4、-6および-7を含めたBMPファミリーの他のメンバーもまた、骨形成活性を有することが示されている（Wozney, 1993）。BMPタンパク質もまた、軟骨、腱、靭帯、神経組織を含めた種々の他の組織に対して誘導活性および／または分化強化活性を実証することが示されている。

#### 【0051】

本発明に従って有用である他の因子としては以下が挙げられる：BMP-3（Vukicevicら, 1989）；増殖因子（例えば、塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF））；グルココルチコイド（例えば、デキサメタゾン（Chengら, 1994））；およびプロスタグランジン（例えば、プロスタグランジンE1（Chenら, 1991））。さらに、アスコルビン酸およびそのアナログ（例えば、アスコルビン酸-2-リン酸（Tennenbaumら, 1982））ならびにグリセロールリン酸（例えば、 $\beta$ -グリセロリン酸（Bruderら, 1991））は、進んだ分化についての有効な補助因子であるが、単独ではこれらは骨形成功分化を誘導しない。他の因子としては、インヒビンA（Chenら, 1993）、軟骨形成刺激活性因子（CSA）（Syftestadら, 1985）、コラーゲン性細胞外マトリックス分子（I型コラーゲンを含む）（特にゲルとして）（Kimuraら, 1984）、およびビタミンAアナログ（例えば、レチノイン酸）（Langilleら, 1989）が挙げられる。

#### 【0052】

本発明においてまた目的であるのは、インスリン様増殖因子である。IGF-IおよびIGF-IIは各々、約7, 500ダルトンの分子量を有する。IGF-IおよびIGF-IIの各々は、プロインスリンの対応するドメインに高度に類似するAドメインおよびBドメインを保有する。AドメインおよびBドメインは、Cドメインによって互いに連結される。カルボキシ末端伸張部であるDドメインは、IGF中に存在するが、プロインスリン中には見出されない。IGF-

I および I G F - I I は両方とも、各々 3 つのジスルフィド架橋を有し、そしてヒトインスリン A鎖および B鎖に対してそれぞれ 49% および 47% の配列同一性を有する、単鎖ポリペプチドである。インスリンと同様に、I G F は、WO 93/98826 に記載されるように、I G F が結合するレセプターの細胞質ドメイン内の特定のチロシン残基のリン酸化を刺激する。名称「インスリン様増殖因子」は、EP 128 733 に記載されるように、多数の細胞に対してマイトジェンとして作用するこれらのポリペプチドのインスリン様効果およびインスリン様構造を表現するために選択された。Rinderknecht (1978a) および (1978b) に記載されるように、I G F - I は 70 アミノ酸ペプチドであり、一方、I G F - I I は 67 アミノ酸ペプチドである。I G F - I および I G F - I I は、互いに 62% の構造的相同性を有する。両方とも、ヒト血清から単離されている。

#### 【0053】

インスリン様増殖因子はソマトメジンというクラス名称でも公知であり、そして種々の組織および細胞型において、特に発生の間に細胞の増殖を刺激するよう に作用するポリペプチドとして種々の動物種において同定されている。ソマトメジンの増殖促進効果としては、細胞繁殖の増強および軟骨増殖の刺激、アミノ酸輸送の刺激、RNA、DNA およびタンパク質の合成の刺激、ならびにプロテオグリカンへのスルフェートの取り込みおよびコラーゲンへのプロリンの取り込みの刺激が挙げられる。多くの哺乳動物の出生後成長は、ソマトメジンによる軟骨増殖の刺激に起因し、そして胎内における成長もまた、ソマトメジン依存性であり得る。

#### 【0054】

本発明に従って利用され得るなお別の重要な増殖因子は、血管内皮増殖因子／血管透過因子 (VEGF/VPF) である。このタンパク質は、低酸素によって刺激され、そして腫瘍新脈管形成に必要とされることが示されている、内皮細胞特異的マイトジェンである。Sangerら (1986) ; Kimら (1993) ; Schweiklら (1992) ; Plateら (1992)。これは、種々の腫瘍および正常細胞によって合成および分泌される、34～43 kDa (約

45 kDaに主な種を有する)の二量体の、ジスルフィド結合した糖タンパク質である。VEGFは、新生血管形成に関連する多くの生理学的状態およびプロセスにおいて本質的役割を果たすようである。

#### 【0055】

##### (V. 無血清培地)

本発明は、骨細胞スフェロイドへの骨形成原細胞の増殖および分化のための無血清培地の使用を要する。以下の節は、無結成培地を使用するための性質および条件を記載する。

#### 【0056】

哺乳動物細胞由来の組換え生物薬剤の製造のための無血清培養の使用が、完全に概説されている (Barnes, 1987; Barnes および Sam, 1980; Broadら、1991; Jayme、1991)。無血清培地のための補充物として使用される主要な添加剤のリストが、Barnes (1987) ならびに Barnes および Sam (1980) によって要約される。大半の市販の無血清培地は、アルブミンのようなキャリアタンパク質を含む。キャリアタンパク質の存在は、細胞生存能の保護に必要とされ得る。

#### 【0057】

無血清培養培地の例は、本明細書中で参考として援用される米国特許第5,063,157号に見出され得る。非付着哺乳動物細胞について記載される培地は、基本培地に加えて、トランスフェリン、インスリン、ペプトン、 $\beta$ -D-キシロピラノース誘導体、亜セレン酸塩および生物学的ポリアミンを含む。哺乳動物細胞についての別の無血清細胞増殖培地は、米国特許第4,443,546号に開示される。この増殖培地は、基本培地に加えて、7つの成分を含む。欧州特許明細書第481,791号は、水、浸透圧調節剤、緩衝液、エネルギー供給源、アミノ酸、鉄供給源、増殖因子および他の任意の成分を含む、CHO細胞についての培養培地を開示する。例示される2つの培地は、それぞれ19個および17個の成分を含む。

#### 【0058】

無血清培地に対する潜在的な添加剤の例は、以下を含む：

## (A. アルブミン)

アルブミンは、好ましくは、細胞増殖に有効な量で、ウシ血清アルブミン (B S A) またはヒト血清アルブミン (H S A) の形態で供給される。アルブミンは、培地において、タンパク質の供給源を提供する。アルブミンは、微量元素および必須脂肪酸に対するキャリアとして作用すると考えられる。好ましくは、本発明の処方において使用されるアルブミンは、発熱物質もウイルスも含まず、そして必要な場合、このアルブミンは、ヒト患者への注入のための調節媒体として認められている。H S Aは、使用前に、樹脂ビーズを用いて脱イオン化され得る。ヒト血清アルブミンの濃度は、1～8 mg/m l、好ましくは、3～5 mg/m l、最も好ましくは、4 mg/m lである。

## 【0059】

## (B. 可溶性キャリア／脂肪酸複合体)

上記で述べられたアルブミンは、可溶性のキャリア／必須脂肪酸複合体、および可溶性のキャリアコレステロール複合体によって置換され得、これらの複合体は、脂肪酸およびコレステロールを、細胞に効率的に送達し得る。このような複合体の例は、シクロデキストリン／リノール酸、コレステロールおよびオレイン酸の複合体である。これは、良く規定された分子による、あまり特徴付けられないアルブミンの置換を可能にするため、有利である。シクロデキストリンの使用は、ヒト／動物血清アルブミンの添加についての必要性を排除し、それによって、アルブミンをこの培地に導入する任意の微量な所望されない物質を排除する。シクロデキストリンの使用は、無血清培養物への特定の脂肪親和性栄養素の添加を単純化する。

## 【0060】

シクロデキストリンと複合体化し得る脂肪親和性物質としては、不飽和脂肪酸（例えば、リノール酸、コレステロールおよびオレイン酸）が挙げられる。リノール酸、コレステロールおよびオレイン酸は、有効量で存在し、そして等しい割合で存在し得、その結果、合計量が、0.001～100 μg/m l、好ましくは、0.1～10 μg/m lである。このような複合体の調製は、当該分野で公知であり、そして例えば、米国特許第4, 533, 637号に記載され、この内

容全体が、本明細書によって参考として援用される。

### 【0061】

#### (C. 鉄供給源)

有効量かつ細胞によって利用され得る形態の鉄供給源が、培地に添加され得る。この鉄は、有効量で、トランスフェリン（鉄のキャリア分子）を飽和することによって供給され得る。このトランスフェリンは、動物の血清由来であり得るか、または組換え的に合成され得る。トランスフェリンが、動物供給源由来である場合、他の動物タンパク質を除去するために精製され、従って、通常は少なくとも99%純粋であることが理解される。このトランスフェリン濃度は、通常は、 $80\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ と $500\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ との間、好ましくは、 $120\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ と $500\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ との間、より好ましくは、 $130\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ と $500\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ との間、なにより好ましくは、 $275\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ と $400\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ との間、そして最も好ましくは、 $300\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ である。鉄塩、好ましくは、水溶性の鉄塩（例えば、有機酸溶液（例えば、クエン酸）のような水溶液に溶解された塩化鉄（例えば、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ））が使用されて、トランスフェリンに鉄を供給する。1モルの塩化鉄が、通常、すべてのモルのクエン酸について使用される。塩化鉄の濃度は、 $0.0008\sim8\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 、好ましくは、 $0.08\sim0.8\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 、最も好ましくは、 $0.08\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ である。

### 【0062】

#### (D. インスリン増殖因子)

インスリンはまた、有効量で、本発明の培地に添加され得る。このインスリン濃度は、 $0.25\text{U}/\text{mL}$ と $2.5\text{U}/\text{mL}$ との間、より好ましくは、 $0.4\sim2.1\text{U}/\text{mL}$ 、最も好ましくは、 $0.48\text{U}/\text{mL}$ である。質量への単位の転換において、 $27\text{U}$ は、 $1\text{mg}$ である。従って、この変換を組み込むと、このインスリン濃度は、約 $9.26\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ と $92.6\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ との間、より好ましくは、 $14.8\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}\sim77.8\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 、最も好ましくは、 $17.7\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ である。ヒトインスリンが、動物のインスリンよりも好ましいことが、重ねて理解される。高度に精製された組換えインスリンが、最も好ましい。インスリン様増殖因子（例えば、インスリン様増殖因子1およびインスリン様増殖

因子2) は、対応する量のインスリンと実質的に同じ結果を提供する量で、インスリンの代わりか、またはインスリンに加えて使用され得る。従って、用語「インスリン増殖因子」は、インスリンおよびインスリン様増殖因子の両方を含む。

#### 【0063】

##### (E. さらなる成分)

上記の必須の試薬への他の脂質の添加は、前駆細胞の増殖能力を増強し得る。しかし、特定の実験に必要か、または特定の型の細胞の増殖に必要ではない限り、これらの成分は、好ましくは添加されない。必要に応じて、トリグリセリドおよび／またはリン脂質は、脂質のさらなる供給源として含められ得る。脂質の好ましい供給源は、主に不飽和の脂肪酸（例えば、リノール酸、オレイン酸、パルミチン酸、リノレン酸およびステアリン酸）の天然のトリグリセリドの混合物を含む。このような調製物はまた、ホスファチジルエタノールアミンおよびホスファチジルコリンを含み得る。脂質の別の供給源は、エタノールによって沈殿したヒトの血漿画分であり、そして好ましくは、低温殺菌によって、ウイルスを含まないようになされる。

#### 【0064】

培地に必要に応じて添加され得る他の成分は、以下の参考文献に引用される：

WO 95/06112、米国特許第4, 533, 637号、米国特許第5, 405, 772号。これらの参考文献すべての内容全体が、参考として援用される。

#### 【0065】

##### (F. 所望されない成分)

培地が、ヒト患者への導入のために細胞を増殖させるために使用される場合、この培地は、好ましくは、ウシ血清アルブミン、哺乳動物血清、および／またはヒトもしくは哺乳動物起源の任意の天然のタンパク質（上記で説明されたような）のような成分を含まない。入手可能であり、かつ高品質であれば、組換えタンパク質または合成タンパク質が使用されることが好ましい。最も好ましくは、組換えタンパク質または合成タンパク質のアミノ酸配列が、ヒトのアミノ酸配列に同一か、または高度に相同である。従って、本明細書中の最も好ましい無血清培地の処方物は、動物由来のタンパク質を含まず、そして検出されない存在の動

物タンパク質さえも有さない。

#### 【0066】

最も理想的な系において、必須ではない任意の成分は、好ましくは、培地に添加されない。このような任意の成分は、上記で引用された先行技術に記載され、そして肉抽出物(meat-extract)、ペプトン、ホスファチジルコリン、エタノールアミン、抗酸化剤、デオキシリボヌクレオシド、リボヌクレオシド、ダイズレシチン、コルチコステロイド、ミオイノシトール、モノチオグリセロール、およびウシまたは他の動物の血清アルブミンからなる群より選択される。

#### 【0067】

##### (V I. 骨の修復を必要とする疾患および状態)

以下は、新しい技術の開発から利益を得て、骨の修復および治癒プロセスを改善する種々の疾患および障害を例示するための4つのヒト状態の簡潔な考察である。以下に加えて、いくつかの他の状態は、例えば、ビタミンD欠損症である。

#### 【0068】

第一の例は、骨折を患う、他の点では健康な個体である。しばしば、臨床的な骨折は、疼痛を緩和するためにギプス包帯することによって処置され、そして自然の修復機構によって、その傷を修復させる。折れた骨の処置において生じ得る種々の合併症を考慮することさえなかったものの、最近では骨折の処置が向上しているが、正常な環境において骨の治癒を増大するためのいかなる新規な手順も、顕著な進歩を示す。

#### 【0069】

新規の処置方法から利益を享受し得る第二の例は、骨形成不全症(OI)である。OIは、ヒトにおける骨および軟性の結合組織の脆弱性を伴う種々の遺伝性の結合組織疾患を含む(ByersおよびSteiner, 1992; Prockop, 1990)。5,000~14,000の出生当たり約1名の子供が、OIに罹患し、そしてこの疾患は、生涯にわたって、重大な病的状態に関連する。高い骨折傾向、および骨折修復後の異常な骨の変形に由来する相当数の死がまた生じる(OI types I I ~ IV; BonadioおよびGoldst

e i n、1993）。ここで関連問題は、生活の質である；明らかに、罹患した個体の生活は、骨折の修復プロセスを刺激し、そして強化するために設計された新規の治療の開発によって改善される。

#### 【0070】

I型OIは、変形を伴わない骨折、青色強膜、正常またはほぼ正常な身長、および常染色体優性遺伝によって特徴付けられる軽い障害である（BonadioおよびGoldstein、1993）。オステオペニアは、歩行の際の長骨（long bone）の骨折速度の増大に関連する（骨折頻度は、思春期および若年成人代で劇的に減少するが、中年後期に、もう一度増加する）。聴覚損失（これは、しばしば、20代または30代に始まる）は、この疾患の約半分の家族における特徴であり、そして骨折頻度の一般的な低下にかかわらず、進行し得る。ぞうげ質形成不全症は、一部の個体において観察される。

#### 【0071】

対照的に、II～IV型OIは、寿命の短縮に関連する、より重篤な障害の範囲を示す。II型OI（周産期の致死形態）は、低い身長、軟性の頭蓋冠、青色強膜、脆弱な皮膚、やせた胸、だらりと垂れたように見える下肢（大腿骨の外側の回転および外転に起因する）、脆弱な腱および韌帯、ひどい変形を伴う骨折、ならびに呼吸不全に起因する周産期における死によって特徴付けられる。骨の虚弱についてのX線撮影の形跡は、大腿骨の圧迫、脛骨のたわみ（bowing）、広くそして数珠状の肋骨および頭蓋冠の非薄化（thinning）を含む。

#### 【0072】

III型OIは、低い身長、三角形の顔、重篤な脊柱側弯症および中程度の変形を伴う骨折によって特徴付けられる。脊柱側弯症は、気腫、および呼吸不全に起因する寿命の短縮を導き得る。IV型OIは、正常な強膜、軽度から中程度の変形を伴う骨折、歯の欠損、および本質的に、II型OIとI型OIとの中間である自然の経過によって特徴付けられる。

#### 【0073】

150より多くのOI変異が、1989年以来特徴付けられている（ByersおよびSteiner、1992；Prockop、1990において概説さ

れる）。大多数は、I型コラーゲンのCOL1A1遺伝子およびCOL1A2遺伝子において生じる。I型OIの大半の症例は、COL1A1遺伝子におけるヘテロ接合性変異に由来するようであり、この変異は、コラーゲンの生成を減少するが、一次構造は変更せず、すなわち、ヘテロ接合性ヌル(null)変異が、COL1A1発現に影響を及ぼす。

#### 【0074】

第三の重要な例は、骨粗鬆症である。用語骨粗鬆症は、骨量の減少および骨折によって特徴付けられる障害の雑多な群をいう。推定上2000万～2500万人の人々が、部位特異的な骨の喪失により、骨折の危険性を増大している。骨粗鬆症についての危険因子としては、加齢、性別(女性により多い)、低い骨量、早い閉経、人種(カフカス人)、低いカルシウム摂取、肉体活動の減少、遺伝因子、環境因子(喫煙、およびアルコールまたはカフェインの濫用を含む)、ならびに転倒傾向を引き起こす神経筋制御の欠損が挙げられる。

#### 【0075】

毎年、米国において100万より多くの骨折が、骨粗鬆症に帰するとされ得、そして1986年だけでも、骨粗鬆症の処置は、推定上70億から100億ドルの医療費を費やした。人口統計学的傾向(すなわち、米国人口の徐々に増加しつつある年齢)は、これらの費用が、2020年までには、620億ドルまで増加し得ることを示唆する。明らかに、骨粗鬆症は、重大な医療問題である。

#### 【0076】

臨床 上、骨粗鬆症は、I型およびII型に分離される。I型骨粗鬆症は、主に、中年女性に生じ、そして閉経期のエストロゲンの喪失に関連する。一方、II型骨粗鬆症は、加齢(advancing age)に関連する。骨粗鬆症に関連する病的状態および死亡率の大半は、骨折後の年輩患者の不動に由来する。

#### 【0077】

骨粗鬆症患者に対する最新の治療は、骨折予防に焦点をあて、骨折の修復ではない。これは、重大な病的状態および死亡率が、年輩の人(特に、股関節部の骨折を患っている人)における長期化したベッドでの静養に関連することを明らかに述べる文献が理由により、重要な問題を残している。ベッドでの静養の合併症

としては、血餅および肺炎が挙げられる。これらの合併症は、認識され、そして処置は、通常、これらの合併症を避けるように講じられるが、このような処置は、とても治療に最善のアプローチではない。従って、骨粗鬆症の患者人口は、骨を強化し、そして骨折の修復プロセスを加速するように設計される新規の治療から利益を得、その治療は、合併症が生じる前に、これらの人々を自分の足で立たせる。

## 【0078】

第四の例は、骨の再形成に関連し、そして具体的には、癌または癌手術の結果としての；出生時欠損症の結果としての；あるいは加齢の結果としての外傷性損傷由来の骨組織における欠損を再形成する能力に関する。より頻繁な整形外科的インプラントに対する顕著な必要性が存在し、そして頭蓋骨および顔面骨が、この型の再形成的な必要性に対する特定の標的である。新規のインプラント材料（例えば、チタン）の利用能は、比較的大きな欠損の修復を可能にした。チタンインプラントは、骨の欠損にわたって、優秀な一時的安定性を提供する。しかし、実験により、この欠損を架橋する存続可能な骨の欠如が、装具の露出、感染、構造的不安定性および最終的に、この欠損の修復失敗を生じさせ得ることが示された。

## 【0079】

自己の骨移植片が、別の可能性であるが、この移植片が、ドナーパート（例えば、腸骨稜または肋骨）から収集されなければならない点で、いくつかの実証された不都合を有する。この移植片は、通常、不十分な骨を提供して、この欠損を完全にふさぎ、そしてこのような形態の骨は、時折、感染および吸収の傾向がある。部分的に精製された異種移植片の調製物は、臨床的用途に実用的ではない。なぜなら、マイクログラム量が、数キログラムのウシの骨から精製され、大規模な市販製品を、高価かつ非実用的とするからである。従って、同種移植片および鉱物質除去された骨調製物が、しばしば利用される。

## 【0080】

接着した軟組織および血管を用いた自由な骨移植片の顕微手術転移は、移植片への即時の血液供給源を用いて、骨の欠損をふさぎ得る。しかし、これらの技術

は、時間がかかり、かなりの病的状態を生じることが示され、そして特別に訓練された人によってのみ用いられ得る。さらに、この骨のインプラントは、しばしば、量が限定され、そして容易に輪郭を描けない。例えば、下顎骨において、大多数の患者は、現在容認されている技術を用いて、歯科用装具をはめることができず（連續性が確立された後でさえも）、従って、咀嚼能力において、ほとんど改善が得られない。Toriumiらは、「再建手術医は、信頼でき、生体適合性があり、使いやすくかつ長持ちし、そして病的状態とほとんど関連せずに、下顎骨の連續性を修復する骨置換を自由に使えるようになるべきである」と記載している。

#### 【0081】

骨の再形成に関連して、改善についての特定の問題のある領域は、外傷によって作製されるような広い欠損、出生時欠損または特に、腫瘍切除後の処置に関する領域；およびまた、人工関節の領域である。整形外科的インプラント、インターフェースおよび人工関節の成功は、おそらく、このインプラントの表面またはインプラントの機能的部分が、骨刺激因子でコーティングされる場合に改善され得る。インプラントの表面は、このインプラントを囲む生物学的部位とのより有効な相互作用を促進するために、そして理想的には、組織修復を促進するためには、1つ以上の適切な材料でコーティングされ得る。

#### 【0082】

(VII. 骨細胞スフェロイド (bone cell spheroid) の移植のためのポリマー)

最近十年間にわたって、ポリマー材料についての適用が、著しく増加している。これらの材料は、Kulkarniら(1971)ならびにHollingerおよびBattistone(1986)によって記載されるように、宿主組織によって置換され、加水分解によって非毒性産物へ分解され、そして排出されるべき一時的な足場として役に立ち得るので、移植に十分に適している。

#### 【0083】

天然のポリマーまたは合成ポリマーのいずれかが使用されて、マトリックスを形成し得るが、合成ポリマーは、再現性および徐放性動態のために好ましい。使

用され得る合成ポリマーとしては、生体腐食性 (biodegradable) ポリマー（例えば、ポリ（ラクチド）（PLA）、ポリ（グリコール酸）（PGA））、ポリ（ラクチドーコーグリコリド）（PLGA）ならびに他のポリ（ $\alpha$ ヒドロキシ酸）、ポリ（カプロラクトン）、ポリカーボネート、ポリアミド、ポリ無水物（poly anhydride）、ポリアミノ酸、ポリオルトエステル、ポリアセタール、ポリシアノアクリレートおよび分解性ポリウレタン）ならびに非腐食性ポリマー（例えば、ポリアクリレート、エチレンービニルアセテートポリマーならびに他のアシル置換セルロースアセテートおよびその誘導体、非腐食性ポリウレタン、ポリスチレン、ポリビニルクロリド、ポリビニルフルオリド、ポリ（ビニルイミダゾール）、クロロスルホン化ポリオリフィン（polyolifin）、ポリエチレンオキシド、ポリビニルアルコールならびにナイロン）が挙げられる。非分解性材料が使用されて、マトリックスまたはマトリックスの一部分が形成され得るが、これらは好ましくない。天然のポリマーの例としては、タンパク質（例えば、アルブミン、フィブリンまたはフィブリノーゲン、コラーゲン、合成ポリアミノ酸およびプロラミン）、ならびに多糖類（例えば、アルギメント、ヘパリンおよび糖単位の他の天然に存在する生分解性ポリマー）が挙げられる。

#### 【0084】

医学的適用において広範に使用される4つのポリマーは、ポリ（パラジオキサン）（PDS）、ポリ（乳酸）（PLA）、ポリ（グリコール酸）（PGA）およびPLAGAコポリマーである。共重合は、材料の分解時間の調節を可能にする。重合の間のアモルファスポリマーに対する結晶性ポリマーの比を変化させることによって、得られる材料の性質は、適用の必要性に適するように変更され得る。ポリ（ラクチドーコーグリコール）酸（PLGA）を含むこれらのポリマーは、Elegendyら（1993）によって報告されるように、骨の置換についてポリマー複合物として使用されている。置換されたポリホスファゼンは、Laurencinら（1993）によって報告されるように、骨形成原細胞の増殖を支持することが示されている。ポリ（オルガノホスファゼン）は、リン原子および窒素原子を交替する骨格を含む高分子量ポリマーである。同じ前駆体ポリ

マーであるポリ(ジクロロホスファゼン)に各々由来する広範な種々のポリホスファゼンが存在する。塩素置換種は、アミノ酸と共に、異なる有機求核試薬(例えば、o-メチルフェノキシド)によって塩素原子を置換することによって、改変され得る。このポリマーの物理学的および化学的性質は、Wadeら(1978)ならびにAllcockおよびFuller(1981)によって記載されるように、種々の比の加水分解感受性側鎖(例えば、グリシン酸エチル)を付加することによって、変更され得る。これは、Laruençinら(1993)によって示されるように、移植可能かつ生分解性の材料としてのポリマーの分解に影響を及ぼし、ならびに骨および組織のインプラントについての骨形成原細胞の支持を変化させる。

## 【0085】

PLA、PGAおよびPLA/PGAコポリマーは、生分解性マトリックスの形成に特に有用である。PLAポリマーは、通常、乳酸の環状エステルから調製される。乳酸のL(+)体およびD(-)体の両方が使用されて、PLAポリマー、ならびにD(-)乳酸およびL(+)乳酸の光学不活性なDL乳酸混合物が調製され得る。ポリラクチドの調製方法は、特許文献においてよく典拠を示される。以下の米国特許(その教示は、本明細書によって参考として援用される)は、詳細に、適切なポリラクチド、その性質およびその調製を記載する:米国特許第1,995,970号;同第2,703,316号;同第2,758,987号;同第2,951,828号;同第2,676,945号;同第2,683,136号;および同第3,531,561号。PGAは、グリコール酸(ヒドロキシ酢酸)のホモポリマーある。ポリ(グリコール酸)へのグリコール酸の転換において、グリコール酸は、最初に、それ自身と反応して、環状エステルグリコリドを形成し、これは、熱および触媒の存在下で、高分子量の線状一鎖状ポリマーに転換される。PGAポリマーおよびその性質は、Cyanamid Research Develops 「World's First Synthetic Absorbable Suture」、Chemistry and Industry, 905(1970)において、より詳細に記載される。

## 【0086】

このマトリックスの侵食は、PLA、PGAまたはPLA／PGAの分子量に関連する。高分子量(90,000以上の平均分子量)は、より長い時間、その構造的完全性を維持するポリマーマトリックスを生じさせ；一方、低分子量(30,000以下の平均分子量)は、より遅い放出およびより短いマトリックス寿命の両方を生じさせる。ポリ(ラクチドーコーグリコリド)(50:50)は、移植後、約6週間で分解する。

#### 【0087】

マトリックスにおける使用についてのすべてのポリマーは、以後の成長および増殖に伴って、細胞に十分な支持を提供するに必要な機械的および生化学的パラメータを満たさなければならない。このポリマーは、Instronテスターを使用して、引っ張り強度のような機械的性質に関して特徴付けられ得、ゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)によって、ポリマー分子量について特徴付けられ得、示差的走査熱量計(DSC)によって、ガラス転移温度について特徴付けられ得、そして赤外(IR)分光法によって、結合構造について特徴付けられ得、エームズアッセイおよびインビトロ奇形遺伝性アッセイを含む初期のスクリーニング試験によって、毒物学に関して特徴付けられ得、そして免疫原性、炎症、放出および分解の研究のための動物における移植研究に関して特徴付けられ得る。

#### 【0088】

これらのポリマーは、移植用の纖維質またはスポンジ型のマトリックスの形成において、特に有用である。ポリマーはまた、細胞が懸濁され、次いで移植されるヒドロゲルを形成するために使用され得る。

#### 【008.9】

##### (A. 他のマトリックス材料)

マトリックスの作製のための別のクラスの材料は、ヒドロキシアパタイト、またはリン酸三カルシウム(TCP)もしくはリン酸カルシウム(CaPO<sub>4</sub>)から形成される類似のセラミックス(ceramic)である。カルシウムヒドロキシアパタイトは、地質学上の堆積物として、そして正常な生物学的組織(主に、脊椎動物の骨、軟骨、エナメル質、ぞうげ質およびセメント質)において、そして病理学的石灰化の多くの部位(例えば、血管および皮膚)において、天然に

存在する。合成カルシウムヒドロキシアパタイトは、純粋な  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ 、または純粋ではなく、他のイオン（例えば、カルボネート、フルオリド、クロリドなど）を含むヒドロキシアパタイト、あるいは、カルシウムの不足した結晶、またはカルシウムが、部分的もしくは完全に、他のイオン（例えば、バリウム、ストロンチウムおよび鉛）によって置換された結晶のいずれかとして、実験室で形成される。本質的にどの地質学的アパタイトおよび生物学的アパタイトも、「純粋な」ヒドロキシアパタイトではない。なぜなら、これらは、種々の他のイオンおよび陽イオンを含み、そして純粋な合成アパタイトとは異なるカルシウム対リンの比を有し得るからである。

### 【0090】

一般的に、純粋な合成アパタイトの結晶、地質学的アパタイトおよび多くの純粋ではない合成的に生成されたアパタイトは、骨、ぞうげ質、セメント質および軟骨の生物学的結晶よりも大きく、そしてより結晶性である。骨、ぞうげ質およびセメント質の結晶は、非常に小さく、不規則な形状の非常に薄い板であり、この板のおよその平均の大きさは、厚さ約  $10\sim50$  オングストローム、幅  $30\sim150$  オングストローム、そして長さ  $200\sim600$  オングストロームである。この合成材料は、文献において報告されるように、非常に多様である。例えば、4つの市販のアパタイトの特徴付けが、Pinholter (1992) によって報告された；Mardenら (1990) は、タンパク質（生分解性材料）について報告する；Pinholter (1991) は、Bio-Oss<sup>TM</sup> と呼ばれるウシの骨の材料の使用について報告する；Friedmanら (1991) およびCostantinoら (1991) は、ヒドロキシアパタイトセメントについて報告する；Roessgen (1990) は、自原性の骨と組み合わせたりン酸カルシウムセラミックスの使用について報告する；Onoら (1990) は、ガラスセラミック顆粒、ヒドロキシアパタイト顆粒およびアルミナ顆粒を含むアパタイトー珪灰石の使用について報告する；Passutিら (1989) は、大きな多孔性 (macroporous) リン酸カルシウムセラミックの性能について報告する；Harada (1989) は、骨の移植のためのヒドロキシアパタイト粒子およびリン酸三カルシウム粉末の混合物の使用について報告する。

; Ohgushiら(1989)は、多孔性のリン酸カルシウムセラミックスの単独および骨髄細胞と組み合わせにおける使用について報告する; Pochonら(1986)は、移植のための $\beta$ リン酸三カルシウムの使用について報告する;そして Glowackiら(1985)は、鉱物質除去された骨のインプラントの使用について報告する。

#### 【0091】

本明細書中で使用される場合、これらの材料のすべては、一般的には、「ヒドロキシアパタイト」といわれる。好ましい形態において、ヒドロキシアパタイトは、約10ミクロン100ミクロンとの間の直径を有する粒子であり、最も好ましくは、約50ミクロンの直径を有する粒子である。

#### 【0092】

リン酸カルシウムセラミックスは、骨欠損の修復において、インプラントとして使用され得る。なぜなら、これらの材料は、非毒性であり、非免疫原性であり、そしてカルシウムイオンおよびリンイオン(骨の主な構成要素)から構成されるからである(Frame、1987; Parsonsら、1988)。リン酸三カルシウム(TCP)  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  およびヒドロキシアパタイト(HA)  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH}_2)$  の両方が、広範に使用されている。リン酸カルシウムインプラントは、骨誘導性(osteoinductive)であり、そして骨に直接結合されるようになる明らかな能力を有する。結果として、強力な骨-インプラント界面が作製される。

#### 【0093】

リン酸カルシウムセラミックスは、一定程度の生体再吸収を有し、これは、その化学的性質および物質構造に左右される。高密度のHAおよびTCPインプラントは、ほとんど再吸収を示さないが、多孔性のインプラントは、体液への溶解によって、より容易に分解され、そして食細胞によって再吸収される。しかし、TCPは、インビトロで、同じ多孔性のHA構造よりも迅速に分解する。HAは、水性環境において、比較的不溶性である。しかし、リン酸カルシウムセラミックスの機械的性質は、このセラミックスを、負荷を負った環境の下で、構造エレメントとして作用させるには不適切にする。セラミックスは、好ましくない。

ぜなら、セラミックスは、碎けやすく、そして衝突荷重に対する抵抗力が低いからである。

#### 【0094】

##### (B. ヒドロゲルを形成するためのポリマー)

展性であるイオン性ヒドロゲルを形成し得るポリマーもまた、細胞を支持するために使用し得る。デバイス全体にわたって細胞を播種する再現性を向上させるため、せん断力または圧力誘導の壞死から細胞を保護するため、または細胞送達の空間的位置の限定を補助するために、細胞懸濁液のポリマー溶液への注入を実行し得る。注入可能なポリマーはまた、任意の他のマトリックスを使用することなく、細胞を送達し新しい組織形成を促進するために利用され得る。好ましい実施形態においては、イオンまたはポリマー濃度のどちらかを増加させることでその強度が高くなるような、イオンを持つポリマーのイオン性塩を架橋することにより、ヒドロゲルを調製する。懸濁液を作るために、ポリマー溶液を移植する細胞と混合し、次にその懸濁液が重合する前に患者に直接注入する。注入した懸濁液は、ポリマーがアルギネートのような多糖である場合、カルシウムなどのインビボでの生理的イオン濃度の存在によってその後短時間のうちに重合する。

#### 【0095】

ゲルを形成するために水分子を捕らえる三次元開格子構造を形成するように有機ポリマー（天然または合成）が共有、イオン、または水素結合で架橋する場合に形成される物質として、ヒドロゲルを定義する。ヒドロゲルを形成するために使用し得る物質の例には、イオン性に架橋されるアルギン酸などの多糖、ポリホスファゼン（polyphosphazene）、およびヒドロキシエチルメタクリレート（HEMA）などのポリアクリレート、または、それぞれ温度またはpHによって架橋されるPluronics<sup>TM</sup> またはTetronics<sup>TM</sup>などのブロックコポリマー、ポリエチレンオキシドーポリプロピレングリコールブロックコポリマーが含まれる。他の物質としては、フィブリノーゲン（fibrinogen）、コラーゲンなどのタンパク質、ポリビニルピロリドン、ヒアルロン酸およびコラーゲンなどのポリマーが含まれる。

#### 【0096】

一般的に、これらのポリマーは、少なくとも、部分的に、水、緩衝化塩溶液、または水性アルコール溶液などの水溶液に可溶であり、電荷を持つ側鎖基またはその一価のイオン性塩を持つ。陽イオンと反応され得る酸性側鎖基を持つポリマーの例は、ポリ(ホスファゼン)、ポリ(アクリル酸)、ポリ(メタクリル酸)、アクリル酸およびメタクリル酸のコポリマー、ポリ(酢酸ビニル)、およびスルホン化ポリスチレンなどのスルホン酸ポリマーである。アクリル酸またはメタクリル酸と、ビニルエーテルモノマーまたはビニルエーテルポリマーの反応によって形成される酸性側鎖基を持つコポリマーもまた使用し得る。酸性基の例として挙げられるのは、カルボン酸基、スルホン酸基、ハロゲン化(フッ素化が好ましい)アルコール基、フェノールOH基、または酸性OH基である。陰イオンと反応され得る塩基性側鎖基を持つポリマーの例として挙げられるのは、ポリ(ビニルアミン)、ポリ(ビニルピリジン)、ポリ(ビニルイミダゾール)、およびある種のイミノ置換されたポリホスファゼンである。ポリマーのアンモニウム塩または第四級塩もまた、バックボーン窒素またはペンドントイミノ基から形成され得る。塩基性側鎖基の例として挙げられるのは、アミノ基およびイミノ基である。

## 【0097】

ヒドロゲルマトリックスを形成するために、水中で室温において、アルギメントを二価陽イオンでイオン性に架橋し得る。これらの穏やかな条件に起因して、アルギメントは、例えば、米国特許第4,352,883号で記述されているように、ハイブリドーマ細胞のカプセル化に最も一般的に使用されるポリマーである。そこに記述されているのは、カプセル化される生体物質を含む水溶液であり、その生体物質は水溶性ポリマー水溶液に懸濁され、その懸濁液は多価陽イオンとの接触により別々のマイクロカプセルへ形成される小滴へ形成され、次いでカプセル化物質の周囲に半透膜を形成するためにマイクロカプセルの表面はポリアミノ酸で架橋される。

## 【0098】

架橋に適したポリホスファゼンは、酸性で二価または三価陽イオンと塩架橋形 成可能な多数の側鎖基を持つ。好ましい酸性側鎖基の例として挙げられるのは、

カルボン酸基およびスルホン酸基である。Ca<sup>2+</sup> またはAl<sup>3+</sup>などのような二価または三価陽イオンで架橋されるカルボン酸側鎖基を持つモノマーから加水分解的に安定なポリホスファゼンを形成する。イミダゾール、アミノ酸エステルまたはグリセロール側鎖を持つモノマーを取り込むことによって加水分解によつて分解するポリマーを合成し得る。生体侵食可能なポリホスファゼンは、少なくとも2つの異なるタイプの側鎖、多価陽イオンとともに塩架橋形成可能な酸性側鎖基、および例えば、イミダゾール基、アミノ酸エステル、グリセロールおよびグルコシルなどの、インビボの条件下で加水分解する側鎖基を持つ。

#### 【0099】

電荷を持つ側鎖基がある水溶性ポリマーを、そのポリマーが酸性側鎖基を持つ場合は多価陽イオン、またはそのポリマーが塩基性側鎖基を持つ場合は陰イオンのいずれかの、反対の電荷の多価イオンを含む水溶液とポリマーを反応させて架橋する。ヒドロゲルを形成することを目的とした酸性側鎖基を持つポリマーの架橋に対して好ましい陽イオンは、アルキルアンモニウム塩などのようなジ、トリ、テトラー官能有機陽イオンも使用し得るが、銅、カルシウム、アルミニウム、マグネシウム、ストロンチウム、バリウムおよびスズなどの二価または三価陽イオンである。柔質で高度に膨潤したヒドロゲルおよび膜を形成するために、これらの陽イオン塩の水溶液をポリマーに添加する。陽イオン濃度が高くなるほど、または価数が高くなるほど、ポリマー架橋の程度が大きくなる。0.005M程度の低濃度のものからポリマーを架橋するということが証明されている。塩の溶解性により、高濃度のものは制限される。ヒドロゲルを形成するためのポリマー架橋に好ましい陰イオンは、例えばテレフタル酸などの低分子量ジカルボン酸、スルフェートイオンおよびカルボネートイオンのような二価および三価の陰イオンである。陽イオンに関して記述しているように、柔質で高度に膨潤したヒドロゲルおよび膜を形成するために、これらの陰イオン塩の水溶液をポリマーに添加する。

#### 【0100】

種々のポリ陽イオンを複合させ、それによってポリマーヒドロゲルを半透過性の表面膜へと安定化するために使用し得る。使用し得る物質の例には、アミン基

またはイミン基のような塩基性反応基を持ち、3,000と100,000の間の好ましい分子量を持つ、ポリエチレンイミンおよびポリリジンのようなポリマーが含まれる。これらは市販されている。ある一つのポリ陽イオンは、ポリ(ルーリジン)であり、合成ポリアミンの例は、ポリエチレンイミン、ポリ(ビニルアミン)およびポリ(アリルアミン)である。多糖、キトサンのような天然ポリ陽イオンもある。ポリマーヒドロゲルにおいて塩基性の表面の基との反応によって半透膜を形成させるために使用し得るポリ陰イオンには、アクリル酸、メタクリル酸および他のアクリル酸誘導体のポリマーおよびコポリマー、スルホン化ポリスチレンのようなペンドントS.O. sub. 3H基を持つポリマー、およびカルボン酸基を持つポリスチレンが含まれる。

#### 【0101】

##### (VIII. DNAベクター)

DNAベクターは、本発明の重要なさらなる局面を形成する。本発明によって、エキソビオで骨細胞スフェロイドの形成を促進することを目的としてRNAおよび/またはタンパク質を発現させるために、これらのベクターの使用を具体的に熟慮する。発現に対して好ましいタンパク質には、TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2、TGF- $\beta$ 1.2、BMP-2、BMP-4およびBMP-7を含むTGF- $\beta$ 遺伝子スーパーファミリーメンバー、PTHのような他の増殖因子、細胞外マトリックス分子、または細胞接着分子が含まれる。「発現ベクターまたは構築物」なる語は、任意のタイプの、一部または全部の核酸コード配列がmRNAに転写可能である遺伝子産物をコードする核酸を含む遺伝子構築物を意味する。転写物は、タンパク質に翻訳され得るが、必要ではない。従って、特定の実施形態において、発現には、遺伝子の転写およびそのRNAの遺伝子産物(タンパク質)への翻訳の両方が含まれる。他の実施形態において、発現とは、例えばアンチセンス構築物を作製することを目的とした核酸の転写のみを含む。

#### 【0102】

特に有用なベクターは、DNAセグメントのコード部分が、全長タンパク質またはより小さいペプチドをコードしているかのいずれにせよ、プロモーターの転写制御下にあるベクターであることが意図される。「プロモーター」とは、特定

の遺伝子転写を開始するのに必要な、細胞の合成機構に認識されるかまたは合成機構を導入されるDNA配列を意味する。「作動可能に位置している」、「制御下にある」または「転写制御下」なる語は、遺伝子のRNAポリメラーゼ開始および発現を制御するために、プロモーターが核酸に関して適切な位置および方向にあることを意味している。

#### 【0103】

プロモーターは、本明細書中で開示する組成物と関連して、例えば組み換えクローニングおよび／またはPCR技術を用いてコードセグメントまたはエキソンの上流に位置する5'非コード配列の分離によって得られ得るような、骨細胞スフェロイド促進タンパク質をコードする遺伝子と天然に会合するプロモーターの形をとり得る。

#### 【0104】

当然、発現のために選択する細胞タイプ、生物、またはさらに動物におけるDNAセグメントの発現を効果的に指向するプロモーターを用いることが重要である。タンパク質発現を目的としたプロモーターおよび細胞タイプの組み合わせを使用することは、一般的に分子生物学の当業者にとって公知である。例えば、本明細書中で参考として援用するSambrookら(1989)を参照すること。使用するプロモーターは、構成的、または誘導可能であり得るし、そして、大スケールの組み換えタンパク質またはペプチド生成に都合が良いような、導入DNAセグメントの高レベル発現を導くために適切な条件下で使用し得る。

#### 【0105】

特に使用するものは、骨組織、骨芽細胞および骨前駆細胞に特異的またはそこで高発現する遺伝子の転写を導くプロモーターおよびエンハンサーである。例えば、発生過程において骨および軟骨組織において大量に発現している1型コラーゲン、アルカリホスファターゼ、オステオポンチン、オステオネクチンおよびオステオカルシンのような他の骨マトリックスタンパク質ならびにc-fosのプロモーターおよびエンハンサーエレメントは、全て、本発明の骨細胞スフェロイド促進構築物の発現に対して有用である。

#### 【0106】

種々の他の実施形態において、核酸の高レベル発現を得るために、ヒトサイトメガウイルス（CMV）最初期遺伝子プロモーター、SV40初期プロモーターおよびラウス肉腫ウイルス長末端反復を使用し得る。発現を遂行するために当該分野において周知の他のウイルスプロモーターまたは哺乳動物細胞プロモーターまたはバクテリアファージプロモーターの使用が、同様に考慮され、但しその発現レベルは、所定の目的に十分である。

#### 【0107】

エンハンサーは、元々、同じDNA分子上の離れた場所に位置するプロモーターから転写を増加する遺伝子エレメントとして検出された。長い距離に渡って作用するその能力は、原核生物転写調節の古典的研究においてはほとんど予想されなかった。その後の研究により、エンハンサー活性を持つDNA領域がプロモーターとほとんど同様に組織されていることが示された。即ち、エンハンサーは多くの個別のエレメントから構成されており、そのエレメントそれぞれが一つ以上の転写タンパク質と結合する。

#### 【0108】

さらに、任意のプロモーター／エンハンサーの組み合わせ（真核生物プロモーターデータベースE PD Bによる）も発現を駆動するために使用し得る。T3、T7またはSP6細胞質発現系の使用は、別の可能な実施形態である。真核細胞は、送達複合体の一部としてかまたさらなる遺伝子発現構築物としてのいずれかで、適切な細菌ポリメラーゼが与えられている場合、特定の細菌プロモーターからの細胞質転写を補助し得る。

#### 【0109】

宿主細胞は一般的に、タンパク質への翻訳に対して機能的なmRNAをもたらすように遺伝子転写を行ので、cDNAおよびゲノム配列の両者とも真核細胞発現に対して適切である。概して、組み換え遺伝子として遺伝子のcDNAバージョンを用いることは、より都合の良いものであり得る。cDNAバージョンを使用することによって、典型的に大きさの等級が上であるかまたはcDNA遺伝子よりも著しく大きいであろうゲノム遺伝子よりも、遺伝子サイズが一般的にかなり小さく、標的細胞にトランスフェクションを行うために容易に使用されるという

長所が得られると考えられている。しかしながら、特定遺伝子のゲノムバージョンを必要であれば用い得ることが熟慮される。

#### 【0110】

「アンチセンス核酸」なる語は、DNAおよびRNAの塩基配列に相補的なオリゴヌクレオチドをいうことを意図する。標的細胞にアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入した場合、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、その標的核酸と特異的に結合し、転写、RNAプロセシング、輸送および／または翻訳を妨害する。オリゴヌクレオチドを用いて二重鎖(ds)DNAに標的化することにより、三重らせん構造がもたらされる。RNAに標的を定めることにより、二重らせん構造がもたらされる。

#### 【0111】

遺伝子のプロモーターおよび他の制御領域(エキソン、イントロンまたはさらにエキソンイントロン境界領域)と結合するように、アンチセンス構築物を設計し得る。宿主細胞中において、インビトロまたはヒト被験者を含む宿主動物中のようなインビボのいずれかで、遺伝子転写または翻訳、またはその両方を阻害するためアンチセンスRNA構築物またはそのようなアンチセンスRNAをコードするDNAを用い得る。「相補的ヌクレオチド」を含む核酸配列は、標準的なWatson-Crickの相補性規則に従った塩基対形成が可能な核酸配列である。即ち、シトシンと対になるグアニン(G:C)の組み合わせおよび、DNAの場合はチミン(A:T)、RNAの場合はウラシル(A:U)と対となるアデニンの組み合わせのみを形成するように、より大きいプリンがより小さいピリミジンと塩基対を形成する。

#### 【0112】

標的化アンチセンス送達の代替として、標的化リボザイムを使用し得る。「リボザイム」なる語は、癌遺伝子DNAおよびRNA中の特定の塩基配列を標的とし、切断することが可能なRNAを基にした酵素を意味する。リボザイム配列を組み込むRNAオリゴヌクレオチドの形で、直接、リボザイムを細胞に標的化し得るか、または、望ましいリボザイムRNAをコードする発現構築物としてリボザイムを細胞に導入し得るかのいずれかである。アンチセンス核酸に関して記

述したものと殆ど同様の方法で、リボザイムを使用し適用し得る。

#### 【0113】

タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドを他の選択タンパク質とともに同時発現させることが提示され、ここでそのタンパク質を同じ細胞中で同時発現させ得るか、または既に他の選択タンパク質を持つ細胞に遺伝子を与え得る。二つの別個の組み換えベクター（各々は、各それぞれのDNAコピーを持つ）を細胞に同時トランスフェクションすることにより、同時発現を遂行し得る。あるいは、両方のタンパク質のコード領域を含有するように単一組み換えベクターを構築し得、次いでこれは、この単一ベクターでトランスフェクトされた細胞中で発現され得る。どちらにしても、本明細書中の「同時発現」なる語は、同一の組み換え細胞中で骨細胞スフェロイド促進遺伝子および他の選択タンパク質の両方を発現することを意味する。

#### 【0114】

##### (IX. 遺伝子移入方法)

細胞中で有効な導入遺伝子発現を媒介するために、細胞へ本発明の発現ベクターを移入することが必要であろう。そのような移入は、ウイルスまたは非ウイルス性の遺伝子移入法を用い得る。この節において、遺伝子移入の方法および組成物に関して議論する。

#### 【0115】

##### (A. ウイルスベクターを介した移入)

細胞への遺伝子移入を媒介するために、骨球促進構築物を感染性粒子に組み入れ得る。本明細書中で記述しているようなさらなる発現構築物もまた、例えば、本明細書中の下記のような本発明アデノウイルスベクターを用いた形質転換によって、感染性ウイルス粒子を用いてウイルスの形質導入を介して移入し得る。あるいは、レンチウイルス、レトロウイルスまたはウシパピローマウイルスを用い得る。両者とも一個または複数の目的遺伝子の宿主細胞への永久的形質転換が可能である。従って、1つの例において、治療に重要な遺伝子を細胞に運ぶために、細胞のウイルス感染を用いる。典型的に、ウイルスの取り込みが可能な生理的条件下で適切な宿主細胞に対してウイルスをただ曝露する。アデノウイルスを例

示しているが、下記で考察しているように、他のウイルスベクターによって本方法を有利に行い得る。

#### 【0116】

(アデノウイルス) アデノウイルスは、そのDNAゲノムの大きさが中程度であり、操作が容易で、高い力価で、広い範囲の細胞を標的とし、高い感染性を持つことで、遺伝子移入ベクターとしての使用に特に適している。概ね36kBのウイルスゲノムは、ウイルスDNAの複製およびパッケージングに必要なシス作用エレメントを含む100～200塩基対(bp)の逆方向末端反復配列(ITS)を結合している。異なる転写単位を含むゲノムの初期(E)または後期(L)領域の範囲は、ウイルスDNA複製開始で分けられる。

#### 【0117】

E1領域(E1AおよびE1B)は、ウイルスゲノムおよび少数の細胞遺伝子の転写調節をもたらすタンパク質をコードする。E2領域(E2AおよびE2B)の発現により、ウイルスDNA複製のためのタンパク質合成が引き起こされる。これらのタンパク質は、DNA複製、後期遺伝子発現、および宿主細胞の遮断(Renan, 1990)に関連するものである。多数のウイルスキャプシドタンパク質を含む後期遺伝子(L1、L2、L3、L4およびL5)産物は、主要後期プロモーター(MLP)によって起こされた一個の初期転写産物の重要なプロセシング後にのみ発現される。MLP(16.8マップ単位に位置する)は、感染後期に特に効率がよく、このプロモーターにより制御されている全てのmRNAは、それらを翻訳に適したmRNAにする5'の3連リーダー(TL)配列を持つ。

#### 【0118】

アデノウイルスを遺伝子治療に対して最適化するために、大きなDNAセグメントを含有し得るように保有能力を最大にすることが必要である。特定のアデノウイルス産物に関連する毒性および免疫性反応を減少させることもまた非常に望ましい。この二つの目標は、アデノウイルスの除去が両端に機能するという点で、ある程度、同一延長にある。本発明の実施により、比較的容易に治療構築物を操作する能力を保持しながら、これら両方の目標を達成することが可能である。

## 【0119】

ウイルスDNA複製に必要とされるシスエレメント全てが線状ウイルスゲノムのどちらか一方の末端の逆方向末端反復（ITR）（100～200bp）に位置するので、DNAの大きな置換が可能である。ITR配列を含むプラスミドは、非欠損アデノウイルスの存在下で複製し得る（Hayら、1984）。従って、アデノウイルスベクターへこれらの領域を含めることは、複製を可能にするはずである。

## 【0120】

さらに、ウイルスキャップシド化（encapsulation）に対するパッケージングシグナルは、ウイルスゲノムの左端の194～385bp（0.5～1.1マップ単位）の間に位置する（Hearingら、1987）。このシグナルは、特異的配列が左端に近接しているが付着末端配列の外に位置するバクテリオファージλDNAにおけるタンパク質認識部位を模倣し、頭部構造へのDNA挿入に必要とされるタンパク質との結合を媒介する。AdのE1置換ベクターは、ウイルスゲノム左端の450bp（0～1.25マップ単位）フラグメントが、293細胞においてパッケージングを指向し得たことを示している（Leveroら、1991）。

## 【0121】

以前から、アデノウイルスゲノムの特定の領域を哺乳動物細胞ゲノムへと組み入れ、それによりコードされる遺伝子を発現させ得るということが示されている。これらの細胞株は、その細胞株によりコードされるアデノウイルス機能を欠くアデノウイルスベクターの複製を支持し得る。例えば野生型ウイルスまたは条件欠損変異体などの「補助」ベクターにより複製欠損アデノウイルスベクターが補完されることもまた報告されている。

## 【0122】

ヘルパーウイルスにより、複製欠損アデノウイルスベクターをトランスで補完し得る。しかしながら、複製機能を与えるために必要とされるヘルパーウイルスの存在によりいずれの調製物も夾雜されるので、この所見のみでは、複製欠損ベクターの単離が可能とはならない。従って、複製欠損ベクターの複製および／ま

たはパッケージングに対する特異性を付加するであろうさらなるエレメントが必要となる。そのエレメントは、本発明に対して提供されるように、アデノウイルスのパッケージング機能に由来するものである。

#### 【0123】

従来のアデノウイルスマップの左端にアデノウイルスに対するパッケージングシグナルが存在するということが示されている (Tibbitts, 1977)。その後の研究において、ゲノムのE1A (194~358 bp) 領域に欠損を持つ変異体は、初期 (E1A) 機能を補足した細胞株でさえあまり増殖しなかったということが示された (HearingおよびShenk, 1983)。変異体の右端に補完するアデノウイルスDNA (0~353 bp) を組み入れた場合、ウイルスは正常にパッケージングされた。さらなる変異解析により、Ad5ゲノムの左端に短い反復性の位置依存性エレメントが同定された。1コピーの反復は、ゲノムのどちらか一方の末端に存在するがAd5DNA分子の内部に向かって移動しなかった場合、能率的なパッケージングに十分であるということが見出された (Hearingら, 1987)。

#### 【0124】

パッケージングシグナル変異バージョンを使用することにより、変動する効率でパッケージングされるヘルパーウイルスを作製することが可能である。典型的に、変異は、点変異または、欠失である。ヘルパー細胞中でパッケージング効率が低いヘルパーウイルスを増殖させた場合、野生型ウイルスと比較して減少した割合であるにもかかわらず、ウイルスがパッケージングされ、それによってヘルパーウイルスの増殖が可能となる。しかしながら、これらのヘルパーウイルスを、野生型パッケージングシグナルを持つウイルスと共に細胞中で培養した場合、変異させたバージョンを超えて野生型パッケージングシグナルが優先的に認められる。パッケージング因子の量を限定した場合、ヘルパーウイルスと比較して野生型シグナルを含有するウイルスが選択的にパッケージングされる。優先度が十分に優れたものであるならば、均一に近い系統が樹立されるはずである。

#### 【0125】

(レトロウイルス) レトロウイルスは、逆転写プロセスにより感染細胞において

てそのRNAを二重鎖DNAに転換する能力によって特徴付けられる一本鎖RNAウイルスのグループである(Coffin, 1990)。次いで、生じたDNAは、プロウイルスのように、安定して細胞中の染色体に入り込み、ウイルスタンパク質の合成を指向する。その挿入の結果、レシピエント細胞およびその子孫細胞にウイルス遺伝子配列を保持するようになる。レトロウイルスゲノムには、キャプシドタンパク質、ポリメラーゼ酵素およびエンベロープ成分をそれぞれコードする三個の遺伝子、gag、polおよびenvが含まれる。gag遺伝子の上流で見られるΨと呼ばれる配列は、ビリオンへのゲノムのパッケージングに対するシグナルとして機能する。二個の長末端反復LTR配列は、ウイルスゲノムの5'および3'末端に存在する。これらは、強いプロモーターおよびエンハンサー配列を含み、また、宿主細胞ゲノムでの組込みにおいて必要とされる(Coffin, 1990)。

#### 【0126】

レトロウイルスペクターを構築することを目的として、複製欠損ウイルスを作製するために、特定ウイルス配列の代わりに、ウイルスゲノムにプロモーターをコードする核酸を挿入する。ビリオンを作製するために、gag、pol、env遺伝子を含むがLTRおよびΨ成分を持たないパッケージング細胞系列を構築する(Mannら、1983)。レトロウイルスLTRおよびΨ配列と共にヒトcDNAを含有する組み換えプラスミドを細胞株に導入(例えば、リン酸カルシウム沈殿法によって)した場合、Ψ配列により、組み換えプラスミドのRNA転写産物がウイルス粒子にパッケージングされるようになり、これは次いで、培養液中に分泌される(NicolasおよびRubenstein, 1988; Temin, 1986; Mannら、1983)。組み換えレトロウイルスを含有する培地を回収し、必要に応じて濃縮し、遺伝子移入に使用する。レトロウイルスペクターは、広く様々な細胞型に感染し得る。しかしながら、多くのタイプのレトロウイルスの挿入および安定な発現には、宿主細胞の分裂が必要である(Paskindら、1975)。

#### 【0127】

レトロウイルスペクターの特異的標的化を可能にするように設計した手法が、

ウイルスエンベロープへのガラクトース残基の化学的付加によるレトロウイルスの化学修飾を基にして最近開発された。この修飾により、所望されるばずである細胞の特異的な感染（アシアロ糖タンパク質レセプターを介した肝細胞など）を可能にし得る。

#### 【0128】

レトロウイルスエンベロープタンパク質および特異的細胞レセプターに対するビオチン化抗体を用いた、組み換えレトロウイルスの標的化に対する別の手法が設計された。その抗体は、ストレプトアビジンを用いてビオチン成分経由で結合された（Rouxら、1989）。主要組織適合性複合体クラスIおよびクラスII抗原に対する抗体を用いて、エコトロピックウイルスによりインビトロで、これらの表面抗原を持つ様々なヒト細胞の感染が実施された（Rouxら、1989）。

#### 【0129】

(アデノ随伴ウイルス) AA Vは、およそ4700塩基対の線状、一本鎖DN Aを利用する。逆方向末端反復がゲノムに隣接する。ゲノム中に二個の遺伝子が存在し、多くの別個の遺伝子産物を生じる。第一に、cap遺伝子から、VP-1、VP-2およびVP-3と呼ばれる三個の異なるビリオンタンパク質(VP)が生成される。第二に、rep遺伝子は、四個の非構造タンパク質(NS)をコードする。一つ以上のこれらrep遺伝子産物は、AA V転写のトランス活性化に関与する。

#### 【0130】

AA Vにおける三個のプロモーターは、ゲノムのマップ単位におけるそれらの位置により名付けられている。これらは、左から右へ、p5、p19、およびp40である。転写により、三個のそれぞれのプロモーターで6個の転写物が生じ、2つは各3つのプロモーターで開始され、各対の1つがスプライシングを受けている。スプライシング部位は、マップ単位42～46由来であり、それぞれの転写物に対して同じである。四個の非構造タンパク質は、明らかに、転写物のうちのより長い転写物由来であり、三個のビリオンタンパク質全てが最小の転写物から生じる。

## 【0131】

AAVは、ヒトの任意の病理学的状態には関係しない。興味深いことに、効率的な複製のためには、AAVは、ウイルス（例えば、I型およびII型単純ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス、仮性狂犬病ウイルス、およびもちろん、アデノウイルス）による「ヘルパー」機能を必要とする。最も良く特徴づけられたヘルパーは、アデノウイルスであり、そしてこのウイルスの多くの「初期」機能が、AAV複製を補助することであることが示されている。AAV repタンパク質の低いレベルでの発現は、AAVの構造的発現を抑制下に維持すると考えられており、そしてヘルパーウィルスの感染は、このブロックを除去すると考えられている。

## 【0132】

AAVベクターの末端反復は、AAVまたはプラスミド（例えば、p201（これは、改変されたAAVゲノムを含む）（Samulskiら、1987）の制限エンドヌクレアーゼ消化によってか、あるいは当業者に公知の他の方法（AAVの公開された配列に基づく末端反復の化学的または酵素的な合成を含むがこれらに限定されない）によって、得られ得る。当業者は、機能（すなわち、安定かつ部位特異的な組み込み）を可能にするために必要とされるAAV ITRの最小配列または一部を、周知の方法（例えば、欠失分析）によって決定し得る。当業者はまた、この配列のいずれのマイナーな改変が、これらの末端反復が安定な部位特異的組み込みを指向する能力を維持しながら、許容され得るかを、決定し得る。

## 【0133】

AAVベースのベクターは、インビトロでの遺伝子送達のための安全かつ有効なビヒクルであることが証明されており、そしてこれらのベクターは、可能性のある遺伝子治療（エキソビボおよびインビボの両方での）における広範な範囲の適用について前臨床および臨床段階において、開発および試験されている（CartierおよびFlotte、1995；Chatterjeeら、1995；Ferrariら、1996；Fisherら、1996；Flotteら、1993；Goodmanら、1994；Kaplittら、1994；1996）。

、Kesslerら、1996；Koeberlら、1997；Mizukamiら、1996；Xiaoら、1996）。

#### 【0134】

肺におけるAAV媒介性の効率的な遺伝子移入および発現は、囊胞性纖維症の処置のための臨床試験を導いた（CarterおよびFlotte、1995；Flotteら、1993）。同様に、骨格筋へのジストロフィン遺伝子のAAV媒介遺伝子送達による筋ジストロフィーの処置、脳へのチロシンヒドロキシラーゼ遺伝子送達によるパーキンソン病の処置、肝臓への第IX因子遺伝子送達による血友病Bの処置、および心臓への血管内皮増殖因子遺伝子による心筋梗塞の潜在的な処置についての見込みは、これらの器官におけるAAV媒介性のトランスジーン発現が、非常に効率的であることが最近示されているので、有望視されている（Fisherら、1996；Flotteら、1993；Kaplittら、1994；1996；Koeberlら、1997；McCownら、1996；Pingら、1996；Xiaoら、1996）。

#### 【0135】

（レンチウイルス）ヒト免疫不全ウイルス（HIV）1型（HIV-1）に基づくレンチウイルスベクターは、遺伝子治療の分野での最近の進歩に貢献している。HIV-1に由来するベクターの鍵となる特性は、分裂していない細胞に感染するそれらの能力である。高力価のHIV-1由来ベクターが生成されている。レンチウイルスベクターの例としては、Whiteら（1999）が挙げられ、これは、HIV、サル免疫不全ウイルス（SIV）および水疱性口内炎ウイルス（VSV）に基づき、そして本発明者らがHIV/SIVpackと称するレンチウイルスベクターを記載する。このベクター系に伴う病原性についての可能性は、最小である。HIV/SIVpack/Gの形質導入能力は、不死化ヒトリンパ球、ヒト初代マクロファージ、ヒト骨髄由来CD34（+）細胞、および初代マウスニューロンを用いて実証された。Gasmil（1999）は、HIV-1ベースのベクターを一過的に生成するための系を記載し、これは、サイトメガロウイルス最初期プロモーターの制御下にHIV-1のgag、polおよびtatをコードする発現プラスミドを使用することによる。

## 【0136】

他のウイルスベクター。他のウイルスベクターが、本発明の発現構築物として使用され得る。ワクシニアウイルス (Ridgeway, 1988; Baichwal および Sugden, 1986; Coupalら, 1988) 、カナリア痘ウイルスおよびヘルペスウイルスのようなウイルスに由来するベクターが、使用され得る。これらのウイルスは、種々の哺乳動物細胞中への遺伝子移入における使用のためのいくつかの特徴を付与する。

## 【0137】

## (B. 非ウイルス性移入)

本発明のDNA構築物は、通常には細胞に送達され、特定の状況においては、その移入される核酸は、非感染性でありそして非ウイルス性の方法を使用して移入され得る。

## 【0138】

培養された哺乳動物細胞内への発現構築物の移入のためのいくつかの非ウイルス性の方法が、本発明によって意図される。これらとしては、以下が挙げられる：リン酸カルシウム沈殿 (GrahamおよびVan Der Eb, 1973; Chen および Okayama, 1987; Rippelら, 1990) 、DEAE-デキストラン (Gopal, 1985) 、エレクトロポレーション (Turr-Kaspalら, 1986; Potterら, 1984) 、直接的なマイクロインジェクション (HarlandおよびWeintraub, 1985) 、DNA充填リポソーム (NicolanおよびSene, 1982; Fraleyら, 1979) 、細胞の超音波処理 (Fechheimerら, 1987) 、高速微粒子 (microinjettile) を使用する遺伝子ボンバードメント (Yangら, 1990) 、およびレセプター媒介トランスフェクション (Wu および Wu, 1987; Wu および Wu, 1988) 。

## 【0139】

一旦、構築物が細胞内に送達されると、骨細胞スフェロイドを増強する構築物をコードする核酸が、種々の部位で配置および発現され得る。特定の実施形態においては、治療遺伝子をコードする核酸は、その細胞のゲノム中に安定に組み込

まれ得る。組み込みは、相同組換え（遺伝子置換）を介して同じ位置および方向であり得るか、またはランダムな非特異的な位置で組み込まれ得る（遺伝子増加）。なおさらなる実施形態においては、核酸は、別々のDNAのエピソームセグメントとして、細胞中で安定に維持され得る。このような核酸セグメントすなわち「エピソーム」は、宿主の細胞周期に非依存的にかまたは同調して維持および複製を可能にするのに十分な配列をコードする。発現構築物が細胞にどのように送達されるか、および細胞内のどこにその核酸が存在するかは、使用される発現構築物の型に依存する。

## 【0140】

本発明の特定の実施形態においては、発現構築物は、リポソーム中に捕捉され得る。リポソームは、リン脂質二重膜および内側の水性媒体によって特徴付けられる、小胞構造である。多重膜リポソームは、水性媒体によって分けられた複数の脂質層を有する。これらは、リン脂質を過剰な水溶液中に懸濁させた場合に、自発的に形成する。これらの脂質成分は、その閉じられた構造の形成の前に自己再構成を起こし、そしてその脂質二重層間への水および溶解された溶質を捕捉する（GhoshおよびBachhawat、1991）。カチオン性リポソームへのDNAの添加は、リポソームから工学的に複屈折性の液体一結晶凝縮化小球への、位相転移を生じる（Radlerら、1997）。これらのDNAー脂質複合体は、遺伝子治療における使用のための可能性のある非ウイルス性のベクターである。

## 【0141】

インビトロでの外来DNAのリポソーム媒介核酸送達および発現は、非常に成功している。β-ラクタマーゼ遺伝子を使用して、Wongら（1980）は、培養したニワトリ胚細胞、HeLa細胞および肝細胞中における、外来DNAのリポソーム媒介送達および発現の可能性を実証した。Nicolaら（1987）は、静脈注射後にラットにおける首尾よいリポソーム媒介遺伝子移入を達成した。「リポフェクション」技術を含む種々の市販のアプローチもまた、含まれる。

## 【0142】

本発明の特定の実施形態においては、リポソームは、血球凝集ウイルス（HVJ）と複合体化され得る。このことは、細胞膜との融合を容易にし、そしてリポソームにカプセル化されたDNAの細胞への侵入を促進することが示されている（Kanedaら、1989）。他の実施形態においては、リポソームは、核の非ヒストン染色体タンパク質（HMG-1）と複合体化され得るか、またはそれと組み合わせて使用され得る（Katohら、1991）。なおさらなる実施形態においては、リポソームは、HVJおよびHMG-1の両方と複合体化され得るか、またはそれらと組み合わせて使用され得る。このような発現構築物が、インビトロおよびインビボでの核酸の導入および発現において首尾よく使用されているという点で、これらは、本発明に適用可能である。

#### 【0143】

治療遺伝子をコードする核酸を細胞へ送達するために使用され得る他のベクタ一送達系は、レセプター媒介送達ビヒクルである。これらは、ほとんど全ての真核生物細胞における、レセプター媒介エンドサイトーシスによる高分子の選択的な取り込みを利用する。種々のレセプターの細胞型特異的分布に起因して、送達は、高度に特異的であり得る（WuおよびWu、1993）。

#### 【0144】

レセプター媒介遺伝子標的化ビヒクルは、一般的には、以下の2つの成分から構成される：細胞レセプター特異的リガンドおよびDNA結合因子。いくつかのリガンドは、レセプター媒介遺伝子移入のために使用されている。最も広範囲に特徴づけられているリガンドは、アシクロオロソムコイド（ASOR）（WuおよびWu、1993）およびトランスフェリン（transferring）（Wagnerら、1990）である。最近、合成の新しい糖タンパク質（これは、ASORと同じレセプターを認識する）が、遺伝子送達ビヒクルとして使用されており（Ferkolら、1993；Peralesら、1994）、そして上皮増殖因子（EGF）もまた、扁平上皮癌細胞に遺伝子を送達するために使用されている（Myers、EPO 0273085）。

#### 【0145】

他の実施形態においては、送達ビヒクルは、リガンドおよびリポソームを含み

得る。例えば、Nicolauら(1987)は、ラクトシルーセラミドであるガラクトース末端アシアロガングリオシドを使用し、リポソーム中に組み込み、そして肝細胞によるインスリン遺伝子の取り込みの増加を観察した。従って、治療遺伝子をコードする核酸が、多くのレセプターリガンド系(リポソームを伴うかまたは伴わない)によって、前立腺、上皮または腫瘍細胞のような細胞型に特異的に送達され得ることが可能である。例えば、ヒト前立腺特異的抗原(Watttら、1986)は、前立腺組織中の核酸の、媒介される送達のためのレセプターとして使用され得る。

#### 【0146】

本発明の別の実施形態においては、発現構築物は、単に、裸の組換えDNAまたはプラスミドから構成され得る。構築物の移入は、細胞膜を物理的または化学的に透過する、上記の任意の方法によって行われ得る。これは、インビトロでの移入について特に適用可能であるが、これは、インビボでの使用にも同様に適用され得る。Dubenskyら(1984)は、CaPO<sub>4</sub>沈殿物形態にあるポリオーマウイルスのDNAを、成体および新生児のマウスの肝臓および脾臓に首尾よく注入し、これは、活性なウイルス複製および急性感染を実証した。BenvenistyおよびNeshif(1986)はまた、CaPO<sub>4</sub>沈殿プラスミドの直接的な腹腔内注射が、そのトランスフェクトされた遺伝子の発現を生じることを実証した。CAMをコードするDNAが、同様の様式でインビボで移入され得そしてCAMを発現し得ることもまた、示される。

#### 【0147】

細胞中に裸のDNA発現構築物を移入するための本発明の別の実施形態は、粒子ボンバードメントを含み得る。この方法は、DNAでコートした微粒子を高速に加速する能力に依存し、これは、細胞を殺すことなくこれらの微粒子が細胞膜を貫通しそして細胞に侵入するのを可能にする(Kleinら、1987)。小さい粒子を加速するためのいくつかのデバイスが開発されている。1つのこのようなデバイスは、電流を発生する高い電圧の放電に依存し、これが、次いで、推進力を提供する(Yangら、1990)。使用される微粒子は、タンゲステンまたは金ビーズのような、生物学的に不活性な物質から構成される。

## 【0148】

## (X. 調節因子およびスクリーニングアッセイ)

なおさらなる実施形態においては、本発明は、骨細胞スフェロイドの形成を調節する新規の化合物を同定するための方法を提供する。「調節化合物」または「骨細胞スフェロイドの形成を調節する化合物」は、骨細胞スフェロイドのエキソビオでの形成またはそれに続く微小骨片 (microspicule) (骨) 形成を増強、阻害または変更する物質をいうことが意味される。このような変更された活性としては、生じ得る骨細胞スフェロイドの形成のタイミングまたは程度における変化が挙げられるが、これらに限定されない。調節化合物はまた、骨形成増殖因子によって供給される活性を置換し得る。

## 【0149】

同定された調節因子は、骨形成に関する方法における有用性を有し、そして治療的用途にもまた意図される。本発明において記載されるアッセイにおいてエキソビオでの骨形成に影響を与える調節因子が、インビオでの骨形成に影響を与えることも考慮される。例えば、骨形成を特異的に調節する能力は、本発明中の他の箇所で記載されているように、いくつかの骨の疾患および欠損に有益である。さらに、調節因子による任意の可能性のある有害な影響の強度は、特異的な位置への調節因子のより特異的な投与によって、制限され得るかまたはさもなければ制御され得る。

## 【0150】

これに関して有用な化合物が、タンパク質化合物またはペプチジル化合物に決して制限されないことがさらに意図される。実際、これは、スクリーニングアッセイの適用を介する同定について最も有用な薬学的化合物が、本質的には非ペプチジルであり、そして例えば、密接な結合または他の化学的な相互作用を通じて骨細胞スフェロイドまたは微小骨片 (骨) の形成を調節するように作用する場合であることが、証明され得る。候補物質は、合成化合物のライブラリーまたは天然のサンプル (例えば、雨林および海洋サンプル) に由来するライブラリーから得られ得る。

## 【0151】

## (A. 骨細胞スフェロイドの形成の調節)

本発明はまた、哺乳動物の骨形成の調節因子を同定するための方法に関し、この方法は、骨形成原細胞または骨前駆細胞を得る工程；骨形成性増殖因子の非存在下での候補調節因子の存在下の無血清条件下でこれらの細胞を培養する工程；骨細胞スフェロイドの形成を測定する工程；およびこの骨細胞スフェロイドの形成を調節因子の非存在下で観察される形成と比較する工程、による。このアッセイにおける骨細胞のスフェロイドおよび微小骨片の形成は、1つ以上の骨形成性増殖因子の存在下で培養された骨形成原細胞または骨前駆細胞の形成に対して比較される。別の実施形態においては、本発明は、骨形成の調節因子を同定するための方法に関し、この方法は、骨形成原細胞または骨前駆細胞を得る工程；TGF- $\beta$ 遺伝子スーパーファミリーの1つ以上の増殖因子の存在下での候補調節因子の存在下の無血清条件下で上記細胞を培養する工程；骨細胞スフェロイドの形成を測定する工程；およびこの骨細胞スフェロイドの形成を調節因子の非存在下で観察された形成と比較する工程、による。このアッセイによって同定された調節因子は、TGF- $\beta$ スーパーファミリーの増殖因子のような増殖因子と相乗的に、増強、阻害または作用することが予測される。

## 【0152】

## (B. 第2の世代の調節因子)

最初に同定された調節化合物に加えて、本発明者らはまた、他の立体的に類似の化合物が、これらの調節因子の構造の鍵となる部分を模倣するように処方され得ることもまた意図する。ペプチド調節因子のペプチド模倣物を含み得る、このような化合物は、その初期の調節因子と同じ様式で使用され得る。

## 【0153】

タンパク質二次構造のエレメントを模倣する特定の化合物は、これらのタンパク質のペプチド骨格が、主に、分子相互作用を促進するような様式でアミノ酸側鎖を配向するよう存在するという原理を使用して、設計される。従って、ペプチド模倣物は、天然分子と同様の分子相互作用を可能にするように設計される。

## 【0154】

このペプチド模倣物概念のいくつかの首尾よい適用は、高度に抗原性であるこ

とが公知である、タンパク質内の $\beta$ -ターンの模倣物に焦点が当てられてきた。おそらく、ポリペプチド中の $\beta$ -ターン構造は、コンピューターに基づくアルゴリズムによって推定され得る。一旦、このターンの成分アミノ酸が決定されると、模倣物は、そのアミノ酸側鎖の必須エレメントの類似する空間的配向を達成するように構築され得る。

#### 【0155】

さらなる構造的な等価物または模倣物の作製は、当業者に公知のモデリング技術および化学的設計技術によって達成され得る。コンピューターに基づく化学的なモデリングの分野は、現在周知である。このような方法を使用して、骨細胞スフェロイドの形成を特異的に調節する化合物が、設計され得そして次いで合成され得、その後、骨細胞スフェロイドの形成を調節するが、他のヒトまたは動物の骨形成特性については特異的ではないか十分には特異的ではない化合物の初期同定を行う。全てのこのような立体的に類似の構築物および第2世代の分子が、本発明の範囲内に入ることが理解される。

#### 【0156】

##### (X I. 実施例)

以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態を実証するために含まれる。以下の実施例に開示される技術は、本発明の実施において十分に機能することが本発明者らによって発見された技術を表し、従って、その実施のための好ましい形態を構成すると考えられ得ることが、当業者に理解される。しかし、本発明の開示を参照して、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、多くの変更が、開示される特異的な実施形態に対してなされ得、そしてなお、類似または同様の結果を得ることが、当業者に理解される。

#### 【0157】

##### (実施例1)

##### (材料および方法)

(骨形成原細胞および細胞株の培養) 骨形成原細胞株（例えば、ヒト骨肉腫細胞（MG 63）を、2 mMのL-グルタミン、ピルビン酸ナトリウム、および10%のウシ胎仔血清（FCS）（Hyclone Labs Inc., Lo

gan, Utah) を含有する RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY) 中で培養した。骨細胞スフェロイドの形成のために、細胞をコンフルエントまで増殖させ、トリプシン処理し、RPMI 中で2回洗浄し、そして 1% の ITS+ (Collaborative Research, Inc.) および 200 pM の TGF- $\beta$ 1 (Collaborative) を含有する無血清培地で直ぐに培養した。他に示されない限り、細胞を、組織培養ディッシュ中に約  $10^3 \sim 10^6$  細胞/ $\text{cm}^2$  の密度でプレートする。コントロールの細胞を、トリプシン処理後に血清含有培地中で 3 ~ 4 時間の間で、プラスチックに接着させた。次いで、この接着細胞層を、無血清培地で 2 回洗浄し、そして TGF- $\beta$ 1 を含んでかまたは含まずに上記のように培養した。

#### 【0158】

(ヒト骨前駆細胞 (H B P C)) H B P C の精製した集団を、以前に記載されている (Longら、1995) ように、ヒト骨髄から単離した。ヒト骨髄を、正常なボランティアから得た。簡潔には、単核細胞を、フィコール (Sigma, St Louis, MO) 上での分離によってヒト骨髄から調製し、そして低密度の細胞を、一晩培養で培養してプラスチック接着細胞を除去した。非接着性の低密度の細胞を回収し、そして記載されている (Longら、1995) ようにプラスチック上に固定した抗オステオネクチン (ON) 抗体および抗オステオカルシン (OC) 抗体に対する免疫接着に供した。これらの免疫接着分子を、トリプシン処理によって回収した。

#### 【0159】

(初代ヒト骨芽細胞) この単離手順は、本質的には、Robey および Termaine (1985) の手順であった。簡潔には、ヒトの骨の小片 (chip) を、(インフォームドコンセントおよび TRB 承認後に) 整形外科手術中に得た。これらを、Collagenase D (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) を用いて 37°C で 2 時間処理し、非接着性の細胞を洗い流し、その骨の断片をミンスし、そして 10% の FCS および Pen/Strep を含有する無 Ca<sup>2+</sup> DMEM (Gibco, Grand Island, NY) 中で培養した。これらの培養物がコンフルエント

になった後、これらの細胞をトリプシン処理によって回収し、そして  $\text{Ca}^{2+}$  含有 D M E M 中で 2~3 週間培養した。骨由来骨芽細胞を、トリプシン処理および遠心分離によって回収した。

## 【0160】

(骨細胞スフェロイドの形成) 3 次元の細胞の発達 (すなわち、骨細胞スフェロイド) を誘導するために、細胞を、トリプシン処理し (継代のために慣用的に行われているように) 、このトリプシンを、血清の添加によって不活化し、これらの細胞を 3 回洗浄し、そしてすぐに 200 pM の T G F- $\beta$  1 を含有する R P M I / I T S<sup>+</sup> (上記を参照のこと) 中で培養した。コントロール細胞を、トリプシン処理後に血清含有培地中で 3~4 時間の間で、プラスチックに接着させた。次いで、この接着細胞層を、無血清培地中で 2 回洗浄し、そして T G F- $\beta$  を伴ってまたは伴わずに、そして T G F- $\beta$  1 を含んでかまたは含まずに上記のように培養した。

## 【0161】

(コラーゲンの合成) 示される回数で、骨細胞スフェロイドを、1% の I T S を含有する無プロリン (proline) D M E M で洗浄し、そして I T S<sup>+</sup> および 100  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$  の (<sup>3</sup>H) プロリン (A m e r s h a m) の存在下で 12 時間インキュベートした。細胞および培地を回収し、そして細胞溶解物を作製した。タンパク質含量を、P i e r c e (R o c k f o r d, I l l i n o i s) 製のキットを使用して、B C A 方法 (S m i t h, 1985) によって概算した。これらの細胞溶解物を凍結乾燥し、そして 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のペプシン (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) を含有する 0.5 M の酢酸で 4°C で一晩抽出した。サンプルを乾燥し、非還元 S D S ゲル緩衝液中に溶解し、そして 5% の S D S - ゲル上で分析した。 $\alpha_1$  (I) および  $\alpha_1$  (I I I) 成分を、遅延還元電気泳動 (S y k e s, 1976) によって分離した。これらのゲルを、A m p l i f y (A m e r s h a m, E n g l a n d) で処理し、そしてその放射性標識したコラーゲンをオートラジオグラフィーによって可視化した。I 型コラーゲンの割合を、以下の式 (F r a n c e s c h i, 1988) を使用して決定した：

【0162】

【数1】

$$\text{I型}\% = \frac{(\alpha_1(I)/2) \times 100}{\alpha_1(I)/2 + \alpha_1(III)/3}$$

(ウエスタン分析) 使用した手順は、本質的には、Towbin (1979) の手順であった。サンプルを、10%のSDS-PAGE上で泳動した。電気泳動によって分離したタンパク質を、ニトロセルロース (Schleicher および Schuell; Keene, NH) に転写し、そして非特異的結合部位を、TBST (10mMのTris、0.15MのNaCl、0.05%のTween 20、pH 7.5) 中の5%のSkimミルクを使用してブロックした。このニトロセルロースメンブレンを、以下の一次抗体：抗オステオネクチン (ON)、抗アルカリホスファターゼ (両方とも、Kenneth Mann博士、University of Vermontから懇意によって譲り受けた) または抗I型コラーゲン (Collaborative) (それぞれ、TBST 中で10 μg/ml)とともに、室温で1時間インキュベートし、TBSTで洗浄し、そして同じ緩衝液中で1:1000希釈での二次抗体 (抗マウス IgG-HRP結合体化; Amersham) で処理した。HRP／抗体で標識されたタンパク質を、増強化学発光 (Pierce) によって可視化した。

【0163】

(アルカリホスファターゼアッセイ (Elias, 1982)) 示された時点で、骨細胞スフェロイドを回収し、PBSで2回洗浄し、そして400で6分間遠心分離した。これらの細胞を、4°Cで30分間溶解させた (1.5MのTris HCl、1mMのZnCl<sub>2</sub>、1mMのMgCl<sub>2</sub>・6H<sub>2</sub>O、pH 9.2、1%の Triton X100)。アルカリホスファターゼ活性を、キット (Sigma) を使用して比色方法によって決定した。この活性を、1mgタンパク質当たりで1時間当たりに形成されたパラニトロフェノールのμmolとしで表した。

## 【0164】

(免疫細胞化学的および組織化学的な染色の手順) 細胞遠心分離調製物を、  
TGF- $\beta$  1によって誘導した細胞のスフェロイドから作製し、そしてオステオ  
ネクチン(抗ON、 $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ )、アルカリホスフェターゼ、およびI型コ  
ラーゲン(抗Collagen I、Sigma)タンパク質を、他で記載されている( Long、1990) ような、アビジンービオチンに基づく免疫細胞化学ABC  
免疫化学的染色キット(Pierce)を使用して検出した。コラーゲンをまた  
、Massonの染色手順(Gomori、1950; Lillie、1940  
、Sigma, St Louisから購入した)によって検出した。組織化学的  
アルカリホスファターゼ活性を、製造業者(Sigma)の説明書に従って決定  
した。最終的な培養物の鉱化作用を、Alizarin Red S (Sigma  
a) 染色手順(pH 5) (McGeeおよびRussell、1958)によっ  
て決定した。

## 【0165】

(フローサイトメトリー分析) MG 63、H B P C、または初代骨芽細胞か  
ら形成された骨細胞スフェロイドを、トリプシンで脱凝集し、その後、 $2\text{mg}/\text{ml}$   
のCollagenase D (Boehringer Mannheim )で処理した。トリプシンの酵素活性を、10%のFCSの添加によって停止さ  
せた。細胞を、間接的な免疫蛍光によって可視化し、そしてFACSCANフロ  
ーサイトメーター(Becton Dickinson, Mountain View, CA)を使用して分析した。一次抗体は、モノクローナル抗ヒト $\alpha$  2、  
 $\alpha$  3、 $\alpha$  4、 $\alpha$  5、 $\beta$  3、または $\beta$  1インテグリン(Becton & Dickin  
son製、San Jose, CA製またはGIBCO製のいずれか)で  
あった。二次抗体は、FITC結合体化抗マウスIgG (Sigma)であった  
。抗体コントロールは、アイソタイプ特異的な不適合抗体であった。

## 【0166】

(細胞凝縮の阻害) 細胞を、 $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ の $\alpha$  2、 $\alpha$  3、および/または  
 $\beta$  1インテグリンに対する中和抗体の存在下で、骨細胞スフェロイドを確立する  
条件(上記のような)下で、血清を含まない培地中で培養した。アイソタイプ特

異的不適合抗体を、ネガティブコントロールとして提供した。抗体を、7日間の培養期間にわたって2日ごとに添加した。EGTA (0.5 mM) をまた、プロマイシン ( $5 \mu M$ ) と同様、細胞凝集の阻害のために使用した。

### 【0167】

(ラマン分光法) 微小骨片を含有している細胞のスフェロイドを、インタクトで試験したか、または細胞を除去するためにトリプシンで処理した。トリプシン処理したサンプルを、表面の有機物を除去するためにメタノール中で繰り返して洗浄し、微小骨片サンプルを、石英スライド上にマウントし、任意の残存しているメタノールを蒸発させ、次いで、石英のカバースライドでカバーした。サンプルの厚みは、それぞれのサンプルによって異なった。複数のラマンスペクトル(すなわち、150~350スペクトル)を、ランダムに選択したラインに沿って、 $2 \mu m$ の間隔で獲得した。 $785 nm$ のレーザー (SDL, Inc.) を、励起源として使用し、そしてレーザーのスポットを、 $10 \times / 0.5 NA$  または  $20 \times / 0.75 NA$  Fluar対物レンズ (Zeiss) のいずれかを備えた、エピ蛍光顕微鏡 (Olympus BH-2) に移す。サンプルを、 $0.125 \mu m$ ステップが可能であるX-Y並進ステージ (X-Y translation stage) (New England Affiliated Technologies, Inc.) によって並進させる。ラマン散乱を回収し、そして分散のために軸方向透過スペクトログラフ (Kaiser Optical systems, Inc. Holospec F/1.8i) に移した。この検出装置は、液体N<sub>2</sub>冷却型の、後方が細い (back thinned) CCDカメラ (Princeton Instruments, Inc.) であった。インタクトな (トリプシン処理していない) サンプルについては、ラマン散乱を、軸方向透過スペクトルグラフ (Kaiser Optical systems, Inc. Holospec VPTシリーズ) に移し、そして検出装置は、水冷却型 ( $-20^{\circ}C$ ) CCDカメラ (Andor, Inc.) であった。このスペクトログラフを、アルゴンまたはネオン放射ランプで較正した。インタクトなおよびトリプシン処理したサンプルの比較は、インタクトな細胞のスフェロイド/微小骨片が、ラマンスペクトルの特定の成分を不明瞭にすることを示し

た。結果として、これらのデータは、トリプシン処理したサンプルについてのみ存在する。ラマン点スペクトルを、15~30秒の積分時間で $2\text{ }\mu\text{m}$ ごとに回収した。 $25\text{ }\mu\text{m}$ のスリット幅によって、 $4\text{ cm}^{-1}$  オーダーのスペクトル解像を生じた。データの分析を、組込み関数および局所的書込み (locality written) 関数を使用して、Matlab (Mathworks, Inc.)において行った。データを、Pentium (登録商標) コンピューター上に保存した。

#### 【0168】

微小骨片から獲得した複数のスペクトルは、各微小骨片を横切るラインに沿つて測定した150~350個のランダムに獲得したスペクトル (Ramanランセクトとして公知) からなった。これらのスペクトルを、Factor Analysis (因子分析) によって分析する。これは、それらのデータが、そのデータを記載する特定の数 (より少ない) の直線の組み合わせ (すなわち、因子) に減少する、多価統計学的分析である。この統計学的なアプローチは、スペクトルの「平均化」 (すなわち、成分スペクトルを抽出すること) の強力な手段である。なぜなら、これは、純粋な構成成分のスペクトルの性質の以前の知見を必要としないからである。多くの場合においては、いくつかの因子が、そのデータセットを完全に示すために必要とされた。代表的には、3~6個の因子 (バックグラウンドの因子を含む) が、データセットの総分散の99.9%よりも大きいものを示すために必要とされた。さらなる因子は、この分析には含まれなかった。多くの例においては、残りは、このデータセット中のノイズの記載から構成された。

#### 【0169】

(透過電子顕微鏡) 初代骨芽細胞から形成された骨細胞スフェロイドを、標準的な手順 (Hayat, 1989) を使用してTEMのために処理した。簡潔には、サンプルを、2%のグルタルアルデヒド中に固定し、そして1%の四酸化オスミウム中にその後で固定した。続く脱水工程の後、サンプルを、Epon中に包埋し、切片化し、染色し、そしてPhilips CM 100電子顕微鏡, (Mahwah, NJ) 上で観察した。

【0170】

## (実施例2)

## (骨細胞スフェロイドおよび微小骨片の形成)

インビボ (Hall および Miyake, 1995; Dunlop および Hall, 1995) ならびにインビトロ (Denker, 1995) の両方において軟骨形成／骨形成における細胞性濃縮の役割を考慮して、本発明者らは、同様のプロセスがヒトの骨のエキソビボでの形成において関係すると考えた。この仮説を試験するために、本発明者らは、ヒトの骨形成原細胞の3つの集団；MG63細胞株（前骨芽細胞骨肉腫細胞株 (Franceschi, 1985)）および他の細胞株（例えば、3T3、SAOS2、およびC310T1/2）、免疫学的に精製したヒトの骨の前駆細胞 (H B P C ; 前骨芽細胞様細胞の集団) (Long, 1995)、ならびに骨のフラグメントのコラゲナーゼでの処理に由来する骨芽細胞 (Robey および Termini, 1985、ならびに表1) を利用した。トリプシン処理のすぐ後のTGF- $\beta$ 1でのこれらの細胞型の無血清処理および続く無血清培養によって、24～48時間以内に、3次元の球形の細胞濃縮物（細胞スフェロイド）の形成を生じることを、本発明者らは観察した（図1、最上列）。分化の誘導と一致して、スフェロイドの形成もまた、それぞれの細胞型において増殖の休止を誘導する。結果として、スフェロイドは、細胞—細胞相互作用の結果として生じ（下記を参照のこと）、そして増殖は生じない。TGF- $\beta$ での処理の最初の24時間の間に、細胞は再度接着し、そして24～48時間の間に、組織培養プラスチックから分離して細胞スフェロイドを形成する。骨細胞スフェロイドは、細胞がTGF- $\beta$ 1の非存在下で培養される場合、細胞が血清の存在下で最初にプラスチックに接着可能である（すなわち、代表的には、継代された）場合、または細胞を継代するために使用された血清含有培地が、その後（すなわち、24時間後）TGF- $\beta$ 1を含有している無血清培地（コントロール）で置き換えられた場合には、形成されない。スフェロイドの形成は、タンパク質合成に依存する。なぜなら、これは、プロマイシンでの処理によって完全にブロックされるからである。これはまた、EGTAの存在によっても阻害され、このことは、スフェロイドの形成におけるカルシウム依存性接着分子

の役割を示唆している（下記のE G T A およびプロマイシンのデータ）。

## 【0171】

（表1. 細胞供給源およびエキソビボで骨を生成する細胞株）

## 【0172】

## 【表1】

細胞供給源	表現型／供給源	骨微小骨片形成
ヒト前骨芽細胞／骨芽細胞	コラゲナーゼ処理した骨	+++
ヒト骨前駆細胞	骨髓	++
MG63 細胞	ヒト骨肉腫	++
C3H10T1/2 細胞	マウス中胚葉	++
SAOS2 細胞	ヒト骨肉腫	+
Hep2G 細胞	肝細胞癌	陰性
A549 細胞	ヒト胚の肺	陰性
NIH3T3 細胞	マウス線維芽細胞	陰性
KG1a 細胞	ヒト骨髓	陰性

スフェロイドの形成の3～5日以内に、細胞性スフェロイドは、小さい骨様の結晶構造を形成し始める（微小骨片（microspicule）と呼ばれる、図1、2列目）。微小骨片は7～10日まで発生し続ける。スフェロイドおよび微小骨片を形成する能力は、骨形成能力を有している細胞に制限され（表1）、そして骨形成原細胞のおよその発達状態およびそれらの細胞のプレーティング密度の両方に比例する（下記）。従って、前骨芽細胞様MG63細胞は、最も少ない微小骨片を形成する（図2）。初期の前骨芽細胞様のヒトの骨の前駆細胞は、中間の数の微小骨片を形成する。骨に由来する骨芽細胞は、微小骨片の形成において（MG63細胞と比較して）7倍の増大を示し、それぞれの細胞スフェロイドが微小骨片を生成する。

## 【0173】

（実施例3）

（エキソビボでのヒトの骨の形成の分析）

微小骨片がヒトの骨を構成することを確認するために、本発明者らは、多数の細胞化学的分析、免疫学的分析、生化学的分析、および物理化学的分析を行った。3つ全てのタイプの細胞に由来するスフェロイドおよび微小骨片の両方ともが、オステオネクチンを発現する（免疫細胞化学的な決定、図1、第3列）。コラーゲンを、マッソン染色（図1、第4列）および抗ヒトI型コラーゲン抗体を使用する免疫細胞化学的な検出（図1、第5列）の両方によって検出する。スフェロイド細胞はまた、アルカリホスフェターゼの酵素活性を強力に発現する（図1、第6列）。最後に、Alizarin Red Sは、3つ全ての細胞型の微小骨片内にリン酸カルシウムの存在を示す（図1、第7列）。同様に、それぞれの骨の細胞型に由来するスフェロイドが、されるテネイシン、骨のシアロタンパク質、およびオステオカルシンを発現した（下記）。本発明者らは、次に、微小骨片とスフェロイド中の細胞との間の構造的な関係を評価した。透過型電子顕微鏡分析は、発達しつつある微小骨片に対して非常に似ている骨に由来する骨芽細胞を示す（図3A）。長期間の細胞質プロセスによって、微小骨片が並ぶことを観察した（図3Aおよび3B）。最後に、高倍率のTEMは、「鉱化作用の最前线」と細胞表面との接近を示す（図3C）。なおさらに、コラーゲンの代表的な640～670Åの結合パターンが、微小骨片内に見られ得る。

#### 【0174】

細胞化学的データおよび免疫学的データは、骨の形成のプロセスと一致するが、これらは、ヒトの骨において見られる炭酸化したアパタイトの存在は示さない。置換されたヒドロキシアパタイトの存在を決定するために、本発明者らは、物理化学的な決定を利用した。碎いた微小骨片の電子顕微分析（EMA）は、1.67～1.7のカルシウム対リン比を示す。これは、精製されたヒドロキシアパタイトのコントロールサンプルにおいて見られるものと一致する。このEMAのデータを確認し、そしてラマンスペクトル分析によって拡張した。ラマンスペクトル分析によって、ゆるく組織された骨の存在と一致する、リン酸および炭酸で置換されたアパタイト種の存在を示す。培養の3日、5日、および7日目に得た微小骨片によるスペクトルの因子分析（Factor Analysis）によつて、リン酸カルシウムアパタイトおよびリン酸一水素イオン（骨の鉱物の代表

的なもの) の明らかな同定を可能にするいくつかのドメインを明らかにした(図4 C)。7日目のサンプルの代表的なラマンスペクトルについては、リン酸カルシウムアパタイトの特徴である、 $958\text{ cm}^{-1}$  での $\nu_1$  リン酸バンドが、最も強いピークである(図4 Cおよび4 D)。速度論的分析においては、リン酸カルシウムアパタイトの存在は、3日目のような初期に検出され、この期間には、微小骨片がトリプシン化を伴わないスフェロイド中には容易に認識されない。これらの速度論的研究はまた、3日目のサンプル中での約 $18\text{ cm}^{-1}$  から7日目のサンプル中での約 $12\text{ cm}^{-1}$  までの $\nu_1$  リン酸のバンドの縮小を示す。これは、リン酸カルシウム相の順での増大を示している。このような縮小のデータは、ラットの増殖プレートのフーリエ変換赤外線(FT-IR)分析と一致し、このことは、肥大した領域の鉱化を増大させながら、 $\nu_1$  リン酸のバンドを鋭さを増大させることを示している(Mendelsohn, 1989; Kimら, 1996; Paschalisら, 1996)。全ての3日目のスフェロイドが、微小骨片の形成の検出可能な領域を含むわけではなく、そして3日目のリン酸カルシウムのスペクトルは、Factor Analysisの後にのみ明らかであったことが注目されるべきである。このことは、リン酸カルシウムの沈着が、骨の形成の初期の間にスフェロイドの特定の領域中にクラスターを形成する傾向にあることを示唆する。

#### 【0175】

アパタイト格子中の炭酸イオン( $\text{CO}_3^{2-}$ ) およびリン酸一水素イオン( $\text{HSO}_4^{2-}$ ) の濃縮は、骨の成熟のマーカーである。Factorによって分離された骨のスペクトルのいくつかにおいては、 $1065\sim1070\text{ cm}^{-1}$  のバンドが見られる(図4 Cおよび4 D)。これらのバンドは、代表的には、B型の炭酸に特異的に対応する炭酸 $\nu_1$  ( $\text{C=O}$ ) のストレッチに割り当てられる。ここでは、炭酸が、アパタイト格子中のリン酸イオンを置換する。このバンドの強度は、一般的には、成熟した皮質骨から抽出されるスペクトルにおいて観察されるものよりも弱い(Rey, 1995および1996)。このことは、わずかに少なく置換された(すなわち、少なく炭酸化された) 骨のミネラルを示す。いくつかの例においては、炭酸はまた、 $1110\text{ cm}^{-1}$  から $1150\text{ cm}^{-1}$  でバ

ンドとして観察され、代表的には、A型の置換された炭酸に関係する。ここでは、炭酸は、アパタイトマトリックス中の一価のヒドロキシイオンを置換する。これらのバンドは、代表的には、あまり顕著ではなく、このことは、これらの微小骨片中のA型の炭酸のバンドに対して高いB型の炭酸のバンドの比を暗に意味している。さらに、ラマントランセクトの分析は、無定形の非結晶タンパク質の領域によって分散された、置換されたアパタイトの結晶の領域を示す。本発明者は、ラマンスペクトル内には明確なコラーゲンのサインを検出しなかった。しかし、微小骨片の形成の間の全ての時間でのI型コラーゲンの、電子顕微鏡検出、生化学的検出、および免疫学的検出は、鉻化の程度がラマンスペクトル分析によるコラーゲンの検出を見かけ上曖昧にするので、これを技術的な（検出）問題とするという解釈を導いた。これによって、TGF- $\beta$ 1によって駆動される骨細胞の濃縮が、ヒトの骨の存在と一致して、微結晶性炭酸化ヒドロキシアパタイトの形成を導くことが確認される。

#### 【0176】

##### (実施例4)

(スフェロイドの形成が、骨に関係しているタンパク質の発現を調節する)

細胞スフェロイドにおける骨のタンパク質の発現の上記の細胞化学的分析を、ウェスタン分析および生化学的分析によって確認した。これらの実験は、TGF- $\beta$ 1依存性の骨細胞スフェロイド形成のプロセスが、コラーゲン様タンパク質および非コラーゲン様タンパク質の両方の相対的な量における増大を生じることを示す。ウェスタン分析は、それぞれの骨形成原細胞型におけるスフェロイドの形成が、TGF- $\beta$ 1の非存在下での無血清条件下で増殖させたコントロール細胞（従って、スフェロイドを形成しない）と比較して、オステオネクチンおよびアルカリホスファターゼの発現を明らかに増大させることを示す（図5A、最上列および中央の列）。コラーゲンの合成を、I型コラーゲンとIII型コラーゲンとを区別するための遅延型（delayed）還元電気泳動（Sykes, 1976）を利用して、トリチウム化プロレンの取り込みによって決定した。これらの電気泳動条件下では、III型コラーゲンは、 $\alpha$ I (III)鎖の単一のバンドとして見られ、そしてI型コラーゲンは、それぞれ2.5対1の比の $\alpha$ I (

I) 鎮および $\alpha$  I I (I) 鎮の2つのバンドとして見られる (Franceschi、1988)。 $^3$ H-プロリンの取り込みの実験は、全ての3個の細胞型によって生成されたコラーゲンが、95%より多い I 型コラーゲンであることを示す (図5、最下例)。MG 6 3細胞およびH B P C細胞の両方が、スフェロイドの形成の後の I 型コラーゲンの合成を顕著にアップレギュレートする。対照的に、ヒトの骨から単離した初代骨芽細胞は、構成的に I 型コラーゲンを発現する。それにもかかわらず、TGF- $\beta$  1依存性の骨細胞スフェロイドの形成は、これらの細胞中でのコラーゲンの合成において2倍から3倍の増大を生じる (コラーゲン鎖の比および密度計による定量的測定)。骨細胞スフェロイドの形成はまた、この3個の骨芽細胞型のそれぞれについてアルカリホスファターゼ活性において顕著な一時的な増大を誘導する (図5B)。最後に、本発明者らは、スフェロイドの形成の間のオステオカルシンの発現を評価した。局所的な少量のこの骨タンパク質を、免疫細胞化学によって検出したが、本発明者らは、ウェスタン分析によってはその発現を確認することはできなかった。このことは、オステオカルシンがこれらの細胞によって少量で生成されるが、その存在は、微小骨片の形成のための絶対的な要件ではないかもしれないことを示す。

#### 【0177】

スフェロイド中での骨細胞の密度を増大させることによってもまた、非コラーゲン様タンパク質の増大した発現を誘導する。本発明者らは、最初に、培養物あたりのスフェロイドの形成の総数が、最初の細胞のプレーティング密度に依存することに注目した。MG 6 3およびコラーゲンを放出する骨芽細胞については、最適なプレーティング密度は、 $2 \sim 4 \times 10^5$  個の細胞 (すなわち、 $\text{cm}^2$ あたり $0.5 \sim 1.0 \times 10^5$  個) であったが、ヒトの骨の前駆細胞は、約10倍多い細胞を必要とした。これらの免疫精製した細胞は約70%の純度である (Long、1995) が、異種細胞の集団が残っており、おそらく、微小骨片の形成を調節し得る他の骨髄由来細胞を含有している。これらの実験は、スフェロイドの形成の間の最適な骨のタンパク質の誘導 (プローブとして抗オステオネクチンを使用する) が、スフェロイドの形成のために必要とされるものと同じ最適なプレーティング密度で生じることを示した (図6A)。従って、本発明者らは、個

々のスフェロイドを単離しそしてプールした。これらは、小さい細胞凝集物、中間の細胞凝集物、および大きい細胞凝集物に、可視的な目視検査によって分類される。これらの単離された骨細胞スフェロイド中でのオステオネクチンの発現の評価は、細胞の密度によって媒介されるプロセスと一致する、漸増するスフェロイドの大きさ（図6B）を伴う相対的な量における増大を示す。

#### 【0178】

骨タンパク質の発現の速度論の評価は、この3個の骨形成原細胞の型の間での異なる時間的な差異を実証する。MG63細胞は、低いレベルのオステオネクチンおよびアルカリホスファターゼの両方を構成的に発現する（図7Aおよび7B、左側のパネル）。スフェロイドの形成の誘導後、MG63細胞によるオステオネクチンの発現は、最初の24時間の間に顕著に増大し、3～5日でプラトーに達し、次いで相対的な量において適度に減少する。MG63細胞中のアルカリホスファターゼの発現は、最初の3日の間はゆっくりとした増大を示し、そして7日まで増大し続ける。ヒトの骨の前駆細胞中では、オステオネクチンおよびアルカリホスファターゼの両方ともが5日間の間増大し、この時、オステオネクチンは相対的な量において鋭く増大する（図7Aおよび7B、中央のパネル）。予想されるように、コラゲナーゼに誘導された骨芽細胞は、微小骨片の形成の期間を通じて酵素アルカリホスファターゼを高いレベルで発現するが、活性は、培養の1日の後に、わずかに減少する。同様に、オステオネクチンは、初代骨芽細胞によって構成的に発現されるが、骨細胞スフェロイドの形成の3～7日後には、その相対的な量は減少する。

#### 【0179】

##### (実施例5)

(細胞：細胞相互作用はスフェロイドの形成を媒介する)

上記のように、スフェロイドの形成は、細胞の増殖よりもむしろ、カルシウム依存性の細胞：細胞相互作用の結果として生じる。このことは、細胞表面の細胞接着リガンドおよびそれらのカウンターレセプターがこのプロセスを媒介することを暗に意味する。多数の推定の細胞接着分子標的（例えば、カドヘリン、セレクチン、およびインテグリン）の評価は、TGF- $\beta$ 1によって誘導されるスフ

エロイドの形成が、 $\beta_1 \alpha_3$  インテグリンおよび $\beta_1 \alpha_2$  インテグリンによって媒介されること（そしてセレクチンおよびカドヘリンは検出されないこと）を示した。この3個の骨形成原細胞の型のそれぞれのフローサイトメトリー分析は、これらが構成的に $\beta_1$  インテグリンを発現することを示した（図8、下列）。スフェロイドの形成は、MG63細胞中での $\alpha_2$  インテグリンの増大した発現およびコラーゲンを放出する初代骨芽細胞を生じ、そしてヒトの骨の前駆細胞中での $\alpha_3$  インテグリン鎖の発現を増大させる（図8、上列）。これらのインテグリンが細胞：細胞相互作用、および続くスフェロイドの形成を媒介するかどうかを決定するために、本発明者らは、個々のインテグリン鎖に対する中和抗体を利用した。それぞれの細胞型について、スフェロイドの形成（従って、微小骨片の発生）の阻害を、抗 $\beta_1$  抗体または適切な抗 $\alpha$ 鎖抗体を用いて観察した（図9）。これらの抗体は、スフェロイドの数において40～60%の阻害を個々に生じ、そしてこれらの抗 $\alpha$ インテグリン抗体および抗 $\beta$ インテグリン抗体の種々の組合せは、スフェロイドの数または大きさをさらには阻害しなかった。このことは、個々の抗体が細胞接着のインテグリン媒介成分を完全に飽和させたことを示唆している。重要なことには、抗インテグリン抗体での処理が、スフェロイドの細胞性を減少させた。結果として、残存しているスフェロイドが微小骨片を生じる場合はほとんどない。最後に、この骨細胞スフェロイドの形成は、EGTAまたはプロマイシンの含有によって完全に阻害される（図9）。

## 【0180】

(実施例6)

(骨形成のサイトカインによる調節)

骨形成に関係している多数のサイトカインの中でも、2個の因子：TGF- $\beta$  およびインシュリン様増殖因子（IGF）が、骨細胞の発達において中心的な役割を果たす。TGF- $\beta$  は、骨の分化の活性中心（軟骨のキャナルおよび骨細胞）中に局在化し、そして骨中で高い密度で見出される。このことは、骨が、最も多いTGF- $\beta$  総量を含有することを示唆している（Massaguer, 1987）。骨の形成の間に、TGF- $\beta$  は軟骨形成を促進し（Massaguer, 1987）、この効果はおそらく、マトリックス成分の沈着を刺激するその能力に

関係する。IgnatzおよびMassague (1986)。軟骨の形成を刺激することに加えて、TGF- $\beta$ が合成され、そして骨細胞培養物中に分泌され、そしてウシの胎児の骨細胞のサブコンフルエントの層の増殖を刺激する。従つて、これは骨細胞の発達のオートクライン（またはパラクリン）調節因子であることを示している。SporriおよびRoberts (1985)。TGF- $\beta$ と同様に、IGFは、骨の中で高濃度で見出される。実際、IGFは、骨の中で最も豊富な増殖因子である (Mohan, 1993、およびその中の参考文献)。TGF- $\beta$ およびIGFタンパク質の両方が、骨の形成に対する骨再吸収の共役に関係している。TGF- $\beta$ は、骨のECM中に潜在性 (latent) 複合体として骨中に存在し、そして破骨細胞の酸性の環境によって活性化されると考えられている。Fawthropら (1992)；BonewaldおよびMundy (1990)。従つて、増大した骨の再吸収によって、TGF- $\beta$ の増大した放出および活性化を生じ、続いてこれは、骨形成原細胞を刺激する。同様に、IGFは骨中で見出されるが、IGF結合タンパク質と複合体化される。Mohan (1993)；Feyenら (1991)。これらのIGF結合タンパク質 (IGFBP) は、IGFの生物学的な作用 (増殖およびマトリックスの合成) を用量依存性の様式で阻害する。Feyenら (1991)。骨の中では、IGF結合タンパク質 (特に、IGFBP-5) がヒドロキシアパタイトおよびIGFの両方に高い親和性で結合する。従つて、骨の再吸収 (TGF- $\beta$ を伴うような) によって、活性なIGFを放出し、これは続いて、パラクリン様式で骨形成原細胞を刺激する。Moham (1993)。骨中の骨形成性増殖因子の保存、およびいくつかの場合においては、骨芽細胞によるそれらの生成の両方についての多くのことが公知であるが、骨の形成におけるそれらの相対的な役割に関してはほとんど理解されていない。

### 【0181】

上記のように、IGF-IIおよびTGF- $\beta$ は、ヒトの骨の細胞外マトリックス (ECM) 中の第1および第2の最も豊富なマイトジェンを示す。重要なことに、IGFは、閉経後の骨粗鬆症においては調節不全であり (Komoriら、1997)、そしてカロリー制限の間に減少する。Bourrinら (200

0)。IGFは、骨芽細胞によって合成され、従って、オートクライイン機能またはパラクリン機能を提供し得る。Farleyら(2000)。さらに、骨芽細胞は、IGF合成を増大させることによる、増大した成長ホルモンまたはカルシトニンのような体液性のシグナルに対して応答する。Farleyら(2000)；Conover(1996)。細胞ベースで、IGFは骨芽細胞の増殖を刺激するように作用し(Farley, 2000；Thomasら, 1999；Zamboniら, 1999)、それによってERK-1およびERK-2のようなMAPキナーゼを活性化し(ChaudharyおよびAvioli, 1998)、そしてc-mycのような初期応答遺伝子を標的化する(Conover Bale, 1998)。骨の形成におけるIGFの役割は複雑であり、そして報告はしばしば矛盾する。IGFがそれらの結合タンパク質(IGFBP)に関連して機能することは、十分に理解されている。IGFBPの6個全部が、高い親和性でIGFに結合し、従って、IGF機能を阻害する。興味深いことに、IGFBPは、分布において骨格依存性または部位依存性の差異を示し(Malpeら, 1997)、ヒトの小柱の骨芽細胞は、IGFBP3、IGFBP4、およびIGFBP5を生成する(Conover, 1996)。TGF- $\beta$ は、この調節ループの一部であり得る。なぜなら、これは、骨芽細胞の発達を刺激すること(SpornおよびRoberts, 1985)、そしてIGFBP4およびIGFBP5の生成を阻害すること(Conover, 1996)の両方であることが公知であるからである。対照的に、IGFBPはまた、骨芽細胞の発達に対してIGFの作用を増大させることが報告されている。従って、IGFBP3のインターナライゼーションおよびプロセシングは、IGFレセプターのシグナル伝達を顕著に増強させるが、単独では効果を有さないIGFBP3での予備処理を必要とすることが、報告されている。同様に、IGFBP5は、インビトロまたはインビボで、単独でかまたはIGFと組合せてのいずれかで、骨芽細胞の増殖を刺激する.Richmanら(1999)。

#### 【0182】

骨の系統への骨髄細胞の方向付け(commitment)を調節する微環境の影響についての情報は、ほとんど存在しない。組織の形成のための絶対的な要

件の1つは、3次元組織構造中での発生シグナルの適切な停止である。例えば、発達によって調節される胚の軟骨細胞の濃縮は、それらの分化、および骨格の最終的な確立を導く。このことと一致して、本発明者らは、最近、3次元の細胞の濃縮が、ヒトの骨のエキソビオでの形成のために必須であることを実証した。

同様のプロセスが、造血性の中心の確立が3次元の細胞構造を示す、マウスの長期間の骨髄培養物（LTBMC）の初期に生じる。しかし、これらの中心の能力は骨形成性となり、そしてこのようなプロセスを調節する微環境因子は、ほとんど理解されていない。

#### 【0183】

従って、本発明者らは、マウスのLTBMCを確立し、そして骨形成のマーカーを発現するそれらの能力をプローブした。本発明者らは、エキソビオでの骨の形成の微環境的な制御を研究するために、骨形成のこれらの研究を拡大した。さらに、本発明者らは、比較的少量の培養容量系（35mmの組織培養皿に対して100mmの組織培養皿から滴下する）を、ヒトの骨芽細胞の良好な利用を可能にするために開発した。マウスの細胞（これは、単一のサイトカインとしてのTGF- $\beta$ に対してあまり旺盛には応答しない）に対するこの改変を使用して、本発明者らは、このプロセスを調節することにおけるIGFの役割を試験した。

ヒトの培養系とは異なり、マウスの骨形成は、分画していない骨髄および血清含有条件を使用して観察された。これらの条件は、異なるが、ヒトの系において観察されるものと性質において非常に似ている微小骨片を生じる。無血清の化学的に規定された培地は、血清含有培地の精製されたものであり、そしてヒトの骨髄もまた、骨形成原細胞を生じるので、マウスのデータは、ヒトに対して直接推定に用いられ得る。

#### 【0184】

個々に、TGF- $b$  (2.5 pM) およびIGF (1.5 pM) は、マウスの骨形成を駆動するわずかな能力を有したが、これらはともに、培養物あたりのvon Kossa陽性の微小骨片の中心（microspicules foci）において顕著な増大（8倍）を生じる（図10）。IGF+TGF- $\beta$ のみが、微小骨片の形成を生じ；他の条件はマトリックスのvon-Kossa陽性の鉱

化のみを生じたが、骨の形成の証拠は生じないことが、注目されるべきである。

1週間以内に、正常なLTBMC (Dexter Cultures) は、骨形成の2個のマーカーを発現する発達中心の顕著な数：コラーゲンの存在（マッソン染色反応によって検出されるような）、およびリン酸カルシウムの存在を検出する陽性のフォン・コッサ染色反応を示す。これらの培養物はまた、組織された微結晶性マウス骨からなる結晶構造（微小骨片（microspicule）と呼ばれる）の存在を示した。内皮細胞は、造血細胞および骨形成原細胞の両についてのサイトカインの重要な供給源である。内皮細胞の重要な調節因子であるVEGFは、内皮細胞および骨細胞の発達の両方に影響を与えることが公知である（しかし、後者が直接的な影響であるかどうかは明らかではない）。LTBMCに対するVEGF (10ng/mL) の添加は、培養物あたりのコラーゲン陽性発達中心およびフォン・コッサ陽性発達中心の数において75～80%の増大を生じる。重要なことには、VEGFもまた、培養物あたりの微小骨片の数の増大を刺激し、それによって培養の最初の3週間の間に、培養物あたりの微小骨片の数において約5倍の増大を生じる。さらに、VEGFは、フォン・コッサ細胞性中心の数を2.5倍増大させ、このことは、VEGFが鉱化に関係していることを示唆している。本発明者らは、マウスのLTBMCが骨形成を促進する条件下で確立され得ると結論付けた。骨形成性の系統への幹細胞の方向付けを調節する調節影響を詳説するためのこれらの培養物の使用が、骨細胞の発達の複雑さを理解するためには重要である。

#### 【0185】

本明細書中において開示されそして特許請求されている全ての組成物および／または方法は、本開示を考慮して過度の実験を行うことなく行われ得、そして実行され得る。本発明の組成物および方法は、好ましい実施態様に関して記載されているが、改変が、本発明の概念、趣旨、および範囲から逸脱することなく、本明細書中に記載されている組成物および／または方法に対して、そして方法の工程または工程の並びにおいて、適用され得ることが、当業者に明らかである。より詳細には、化学的および生理学的の両方で関係している特定の薬剤が、本明細書中に記載されている薬剤に代わって置換され得る、同じ結果または同様の結果

が達成されることが、明らかである。当業者に明らかである全てのこのような類似の置換および改変が、添付の特許請求の範囲によって規定されるような、本発明の趣旨、範囲、および概念の内であると考えられる。

## 【0186】

## (参考文献)

以下の参考文献は、本明細書中に示される詳細を補足する例示的な手順上の詳細もしくは他の詳細をそれらが参考文献を提供する程度まで、本明細書中で参考として特に援用される。

## 【0187】

## 【表2】

- Allcock & Fuller, "Synthesis and Hydrolysis of Hexakis(imidazolyl)cyclotriphosphazene," *J. Am. Chem. Soc.*, 103, 2250-2256, 1981.
- Aubin et al., *J. of Cell Biol.* 92:452-461, 1982.
- Baichwal and Sugden, In: *Gene Transfer*, Kucherlapati R, ed., New York, Plenum Press, pp. 117-148, 1986.
- Barnard et al., *Biochim. Biophys. Acta.* 1032:79-87, 1990.
- Barnes and Sam, "Serum-free cell culture: A unifying approach," *Cell* 22: 649-655, 1980.
- Barnes, "Serum-free animal cell culture," *Bio Techniques* 5: 534-542, 1987.
- Benvenisty and Neshif, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 83:9551-9555, 1986.
- Bonadio and Goldstein, "Our understanding of inherited skeletal fragility and what this has taught us about bone structure and function," in *Molecular and Cellular Biology of Bone*, Noda, M., ed., Academic Press, Inc., San Diego, Calif. pp. 169-189, 1993.
- Bonewald & Mundy, "Role of transforming growth factor-beta in bone remodeling." *Clin Orthop* 250:261-276, 1990.
- Bourrin et al., "Dietary protein restriction lowers plasma insulin-like growth factor I (IGF-I), impairs cortical bone formation, and induces osteoblastic resistance to IGF-I in adult female rats." *Endocrinol* 141:3149-3155, 2000.
- Broad, Boraston, and Rhodes, "Production of recombinant proteins in serum-free media," *Cytotechnology* 5: 47-55, 1991.
- Bruder and Caplan, *Bone*, 10:359-375, 1989.
- Bruder and Caplan, *Bone*, 11:189-198, 1990.
- Bruder et al., *Trans. Ortho. Res. Soc.*, 16:58, 1991.
- Bruylants et al., *Cancer Res.*, 48:5302-5308, 1988.
- Byers and Steiner, "Osteogenesis imperfecta," *Annu. Rev. Med.* 43:269-289, 1992.
- Carter and Flotte, *Gene Ther.* 2(6):357-62 1995.
- Centrella, "Transforming growth factor  $\beta$  is a bifunctional regulator of replication and collagen synthesis in osteoblast-enriched cell cultures from fetal rat bone," *J. Biol. Chem.* 262:2869-2874, 1987.
- Chatterjee, et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 770:79-90, 1995.

- Chaudhary & Avioli, "Identification and activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase in normal human osteoblastic and bone marrow stromal cells: attenuation of MAP kinase activation by cAMP, parathyroid hormone and forskolin." *Mol Cell Biochem* 178:59-68, 1998.
- Cheifetz et al., *Cell* 48, 409-415, 1987.
- Chen and Okayama, *Mol. Cell Biol.*, 7:2745-2752, 1987.
- Chen et al., *Exp. Cell Res.*, 195:509, 1991.
- Chen et al., *Exp. Cell Res.*, 206:199, 1993.
- Chen, Weinberg, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 92:1565-1569, 1995.
- Cheng et al., *Endocrinology*, 134:277, 1994.
- Coffin, In: *Virology*, ed., New York: Raven Press, pp. 1437-1500, 1990.
- Conover, CA, "The role of Insulin-like growth factors and binding proteins in bone cell biology," in Rodan GA, Raisz LG, Rodan GA (eds): *Principles of Bone Biology*, New York, Academic Press, 1996, p 607-626.
- Conover & Bale, "Insulin-like growth factor I induction of c-myc expression in bovine fibroblasts can be blocked by antecedent insulin receptor activation." *Exp Cell Res* 238:122-127, 1998.
- Costantino et al., *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 117(4), 379-384, 1991.
- Coupar et al., *Gene*, 68:1-10, 1988.
- "Cynamid Research Develops World's First Synthetic Absorbable Suture," *Chemistry and Industry*, 905 (1970).
- De Martin et al., *EMBO J.* 6, 3673-3677, 1987.
- Denker, "Formation of cartilage-like spheroids by micromass cultures of murine C3H10T1/2 cells upon treatment with transforming growth factor- $\beta$ 1," *Differentiation* 59:25-34, 1995.
- Denker, Nicoll, Tuan, "Formation of cartilage-like spheroids by micromass cultures of murine C3H10T1/2 cells upon treatment with transforming growth factor-beta 1," *Differentiation* 59:25-34, 1995.
- Derynck et al., *J. Biol. Chem.* 261, 4377-4379, 1986.
- Derynck et al., *Nature* 316, 701-705, 1985.
- Doctor et al., *Dev. Biol.* 151:591-505, 1992
- Dubensky et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 81:7529-7533, 1984.

- Dunlop, Hall, "Relationships between cellular condensation, preosteoblast formation and epithelial-mesenchymal interactions in initiation of osteogenesis," *International Journal of Developmental Biology* 39:357-371, 1995.
- Elgendi et al., "Osteoblast-like cell (MC3T3-E1) proliferation on bioerodible polymers: An approach towards the development of a bone-bioerodible polymer composite material," *Biomaterials*, 14, 263-269, 1993.
- Elias, in *Principles and Techniques in diagnostic histopathology*, Park Ridge, NJ, Noyes Publication, 248-250, 1982.
- Embleton et al., *Br J Cancer*, 43:582-587, 1981.
- EP 128 733
- EP 273 085
- EP 481 791
- Farley et al., "Calcitonin increases the concentration of insulin-like growth factors in serum-free cultures of human osteoblast-line cells." *Calc Tiss Res* 67:247-254, 2000.
- Fawthrop et al., "The effect of transforming growth factor beta on the plasminogen activator activity of normal human osteoblast-like cells and a human osteosarcoma cell line MG-63." *J Bone Miner Res* 7:1363-1371, 1992.
- Fechheimer et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 84:8463-8467, 1987.
- Ferkol et al., *FASEB J.*, 7:1081-1091, 1993.
- Ferrari et al., *J. Virol.*, 70:3227-3234, 1996.
- Feyen et al., "Recombinant human [Cys281]insulin-like growth factor-binding protein 2 inhibits both basal and insulin-like growth factor I- stimulated proliferation and collagen synthesis in fetal rat calvariae." *J Biol Chem* 266:19469-19474, 1991.
- Fisher et al., *J. Virol.*, 70:520-532, 1996.
- Flotte et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 90:10613-10617, 1993.
- Fraley et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 76:3348-3352, 1979.
- Frame, *Int J Oral Maxillofac Surg.* 16(6):642-55, 1987.
- Franceschi, "1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D3 specific regulation of growth , morphology, and Fibronectin in a human osteosarcoma cell line," *J Cell Physiol* 123:401-409, 1985.
- Franceschi, "Regulation of Type I Collagen Synthesis by 1,25-Dihydroxyvitamin D3 in Human Osteosarcoma cells," *J Biol Chem* 263:18938-18945, 1988.
- Friedman et al., *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 117(4), 386-389, 1991.
- Gasmi, Glynn, Jin, Jolly, Yee, Chen, "Requirements for efficient production and transduction of human immunodeficiency virus type 1-based vectors," *J Virol* 73(3):1828-34, 1999.

- Gerhart *et al.*, *Trans Orthop Res Soc*, 16:172, 1991.
- Ghosh and Bachhawat, In: *Liver diseases, targeted diagnosis and therapy using specific receptors and ligands*, (Wu G, Wu C ed.), New York: Marcel Dekker, pp. 87-104, 1991.
- Glowacki *et al.*, *Clin. Plast. Surg.* 12(2), 233-241, 1985.
- Gomori, "A rapid one-step trichrome stain," *Am J Clin Pathol* 20:661, 1950.
- Goodman *et al.*, *Blood*, 84:1492-1500, 1994.
- Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190, 1985.
- Graham and Van Der Eb, *Virology*, 52:456-467, 1973.
- Hall, Miyake, "Divide, accumulate, differentiate: cell condensation in skeletal development revisited," *International Journal of Developmental Biology* 39:881-893, 1995.
- Hall, Miyake, "The membranous skeleton: the role of cell condensations in vertebrate skeletogenesis," *Anatomy & Embryology* 186:107-124, 1992.
- Harada, *Shikwa-Gakuho* 89(2), 263-297, 1989.
- Harlow & Lane, *Antibodies "A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.
- Hay *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 175:493-510, 1984.
- Hayat in *Principles and Techniques of Electron Microscopy. Biological Applications.*, Boca Raton, Florida, CRC Press, Inc., 1989.
- Hearing and Shenk, *J. Mol. Biol.* 167:809-822, 1983.
- Hearing *et al.*, *J. Virol.*, 67:2555-2558, 1987.
- Heiner *et al.*, *Cancer Res*, 47:5377-5384, 1987.
- Hollinger and Battistone, "Biodegradable Bone Repair Materials," *Clinical Orthopedics and Related Research*, 207, 290-305, 1986.
- Hosoi *et al.*, *Cancer Res*, 42:654-661, 1982.
- Ignatz & Massague, "Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix." *J Biol Chem* 261:4337-4345, 1986.
- Jayme, D. *Cytotechnology* 5(1):15-30, 1991.
- Kaneda *et al.*, *Science*, 243:375-378, 1989.
- Kaplitt *et al.*, *Nat. Genet.*, 8:148-153, 1994.
- Kato *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 266:3361-3364, 1991.
- Kessler *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 93:14082-14087, 1996.
- Kim, Rey, Glimcher, "X-ray diffraction, electron microscopy, and Fourier transform infrared spectroscopy of apatite crystals isolated from chicken and bovine calcified cartilage," *Calcif Tissue Int* 59:58-63, 1996.

- Kimura et al., *Biomed. Res.*, 5:465, 1984.
- Kim et al., *Nature* 362:841-844, 1993.
- Klein et al., *Nature*, 327:70-73, 1987.
- Koeberl et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 94:1426-1431, 1997.
- Kojima et al., *J. Cell Biol.* 113(6):1439-1445, 1991.
- Komori et al., "Targeted disruption of Cbf $\alpha$ 1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts [see comments]." *Cell* 89:755-764, 1997.
- Kulkarni et al., *J. Biomedical Materials Research*, 5, 169-81, 1971.
- Langille et al., *Differentiation*, 40:84, 1989.
- Laurencin et al., "Use of polyphosphazenes for skeletal tissue regeneration," *J. Biom. Mater. Res.*, 27, 1993.
- Lawson et al., *Clin Chem*, 31:381-385, 1985.
- Levrero et al., *Gene*, 101:195-202, 1991.
- Lillie, "Further experiments with Massons trichrome modification of Mallory's connective tissue stain," *Stain Technol* 15:17, 1940.
- Long, "Expression of human bone-related proteins in the hematopoietic microenvironment," *J Clin Invest* 86:1387-1395, 1990.
- Long, "Regulation of human bone marrow-derived osteoprogenitor cells by osteogenic growth factors," *J Clin Invest* 95:881-887, 1995.
- Malpe et al., "Insulin-like growth factor (IGF)-I, -II, IGF binding proteins (IGFBP)-3, -4, and -5 levels in the conditioned media of normal human bone cells are skeletal site-dependent." *J Bone Min Res* 12:423-430, 1997.
- Mann et al., *Cell*, 33:153-159, 1983.
- Marden et al., *J. Craniofac. Surg.* 1(3), 154-160, 1990.
- Marquardt et al., *J. Biol. Chem.* 262:12127-12131, 1987.
- Massague, J, "The TGF-beta family of growth and differentiation factors." *Cell* 49:437-438, 1987.
- Massague et al., *Trends Cell Biol.* 4:172-178, 1994.
- McCown et al., *Brain Res.*, 713:99-107, 1996.
- McGee, Russell, "Histochemical methods for calcium," *J Histochem* 6:22-42, 1958.
- Mendelsohn, "FT-IR microscopy of endochondral ossification at 20 $\mu$  spatial resolution," *Calcif Tissue Int* 44:20-24, 1989.

- Miyake, Cameron, Hall, "Stage-specific onset of condensation and matrix deposition for Meckel's and other first arch cartilages in inbred C57BL/6 mice," *Journal of Craniofacial Genetics & Developmental Biology* 16:32-47, 1996.
- Miyazono *et al.*, *Adv. Immunol.* 55:181-220, 1994.
- Mizukami *et al.*, *Virology*, 217:124-130, 1996.
- Mohan, S: Insulin-like growth factor binding proteins in bone cell regulation. *Growth Regulation* 3:67-70, 1993.
- Nicolas and Rubenstein, In: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodriguez and Denhardt (eds.), Stoneham: Butterworth, pp. 493-513, 1988.
- Nicolau and Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190, 1982.
- Nicolau *et al.*, *Methods Enzymol.*, 149:157-176, 1987.
- Nikol *et al.*, *J. Clin. Invest.* 90:1582-1592, 1992.
- Oberleender, Tuan, "Spatiotemporal profile of N-cadherin expression in the developing limb mesenchyme," *Cell Adhesion & Communication* 2:521-537, 1994.
- Ohgushi *et al.*, *Acta Orthop. Scand.* 60(3), 334-339, 1989.
- Ono *et al.*, *Biomaterials* 11(4), 265-271, 1990.
- Padgett *et al.*, *Nature (London)*, 325:81-84, 1987.
- Parsons *et al.*, *Ann NY Acad Sci.* 523:190-207, 1988.
- Paschalis, Jacenko, Olsen, Mendelsohn, Boskey, "Fourier transform infrared microspectroscopic analysis identifies alterations in mineral properties in bones from mice transgenic for type X collagen," *Bone* 19:151-156, 1996.
- Paskind *et al.*, *Virology*, 67:242-248, 1975.
- Passuti *et al.*, *Clin. Orthop.* 248, 169-176, 1989.
- Perales *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 91:4086-4090, 1994.
- Ping *et al.*, *Microcirculation*, 3:225-228, 1996.
- Pinholt *et al.*, *J. Oral Maxillofac. Surg.* 50(8), 859-867, 1992.
- Pinholt *et al.*, *Scand. J. Dent. Res.* 99(2), 154-161, 1991.
- Plate *et al.*, *Nature* 359:845-848, 1992.
- Pochon *et al.*, *Z-Kinderchir.* 41(3), 171-173, 1986.
- Potter *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 81:7161-7165, 1984.
- Prockop, "Mutations that alter the primary structure of type I collagen. The perils of a system for generating large structures by the principle of nucleated growth," *J. Biol. Chem.* 265:15349-15352, 1990.
- Radler *et al.*, *Science*, 275:810-814, 1997.

- Renan, *Radiother. Oncol.*, 19:197-218, 1990.
- Rey, "Characterization of the apatite crystals of bone and their maturation in osteoblast cell culture: Comparison with native bone crystals," *Connective Tiss Res* 35:397-403, 1996.
- Rey, "Structural and chemical characteristics and maturation of the calcium-phosphate crystals formed during the calcification of the organic matrix synthesized by chicken osteoblasts in cell culture," *J Bone Miner Res* 10:1577-1588, 1995.
- Richman et al., "Recombinant human insulin-like growth factor-binding protein-5 stimulates bone formation parameters *in vitro* and *in vivo*." *Endocrin* 140:4699-4705, 1999.
- Ridgeway, In: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodriguez RL, Denhardt DT, ed., Stoneham:Butterworth, pp. 467-492, 1988.
- Rinderknecht, *J. Biol. Chem.* 253:2769 (1978a).
- Rinderknecht, *FEBS Lett* 89:283 (1978b).
- Rippe et al., *Mol. Cell Biol.*, 10:689-695, 1990.
- Roberts and Sporn, eds. *The Transforming Growth Factor- $\beta$ s in Peptide Growth Factors and Their Receptors. I. Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. 95/I (Springer-Verlag, Berlin,) 419-472, 1990.
- Robey and Termine, "Human bone cells *in vitro*," *Calcif Tissue Int* 37:453-460, 1985.
- Roesgen, *Unfallchirurgie* 16(5), 258-265, 1990.
- Roux et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 86:9079-9083, 1989.
- Sambrook et al., In: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- Samulski et al., *J. Virol.*, 61(10):3096-3101, 1987.
- Sanger et al., *Cancer* 46:5629-5632, 1986.
- Schweiki et al., *Nature* 359:843-845, 1992.
- Sharples et al., *DNA* 6, 239-244, 1987.
- Shull, Tracy, and Mann, "Identification of a vitamin D responsive protein on the surface of human osteosarcoma cells," *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:5405-5410, 1989.
- Smith, "Measurement of protein using bicinchoninic acid," *Anal Biochem* 150:76-85, 1985.
- Sporn et al., *Science*, 233:532-534, 1986.
- Sporn & Roberts, "Autocrine growth factors and cancer." *Nature* 313:745-747, 1985.
- Stringa, Love, McBride, Suyama, Tuan, "In vitro characterization of chondrogenic cells isolated from chick embryonic muscle using peanut agglutinin affinity chromatography," *Exp Cell Res* 232:287-294, 1997.
- Syftestad et al., *Differentiation*, 29:230, 1985.

Sykes, "The estimation of two collagens from human dermis by interrupted gel electrophoresis," *Biochem Biophys Res Commun* 72:1472-1480, 1976.

Temin, In: *Gene Transfer*, Kucherlapati (ed.), New York: Plenum Press, pp. 149-188, 1986.

Ten Dijke et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci USA* 85, 4715-4719, 1988.

Tenenbaum et al., *Calcif. Tissue Int.*, 34:76, 1982.

Thomas et al., "Response of bipotential human marrow stromal cells to insulin-like growth factors: effect on binding protein production, proliferation, and commitment to osteoblasts and adipocytes." *Endocrinology* 140:5036-5044, 1999.

Tibbetts *Cell*, 12:243-249, 1977.

Toriumi et al., *Arch. Otolaryngol Head Neck Surg.*, 117:1101-1112, 1991.

Towbin, "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications," *Proc Nat'l Acad Sci USA* 76:4350-4354, 1979.

Tsai et al., *Cancer Res.*, 50:152-161, 1990.

Tur-Kaspa et al., *Mol. Cell Biol.*, 6:716-718, 1986.

Turkseh et al., *J Histochem Cytochem*, 40:1339-1352, 1992.

米国特許第1,995,970号

米国特許第2,676,945号

米国特許第2,683,136号

米国特許第2,703,316号

米国特許第2,758,987号

米国特許第2,951,828号

米国特許第3,531,561号

米国特許第4,352,883号

米国特許第4,443,546号

米国特許第4,533,637号

米国特許第5,013,649号

米国特許第5,643,736号

米国特許第5,972,703号

Vukicevic et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 86:8793, 1989.

Wade et al., "Biocompatibility of eight poly(organophosphazenes)," in *Organomet. Polym.*, C. E. Carraher, J. E. Sheats and C. U. Pittman, Jr., Eds., Academic Press, New York, pp. 283-288, 1978.

Wagner et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 87(9):3410-3414, 1990.

Walsh et al., *J Bone Miner Res.*, 9:1687-1696, 1994.

- Watt *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 83(2): 3166-3170, 1986.
- Weeks and Melton, *Cell*, 51:861-867, 1987.
- White *et al.* "Lentivirus vectors using human and simian immunodeficiency virus elements," *J Virol.* 73(4):2832-40, 1999.
- WO 93/98826
- WO 95/06112
- Wong *et al.*, *Gene*, 10:87-94, 1980.
- Wong, Tuan, "Interactive cellular modulation of chondrogenic differentiation *in vitro* by subpopulations of chick embryonic calvarial cells," *Developmental Biology* (Orlando) 167:130-147, 1995.
- Woodward, Tuan, "N-Cadherin expression and signaling in limb mesenchymal chondrogenesis: stimulation by poly-L-lysine," *Developmental Genetics* 24:178-187, 1999.
- Wozney, "Bone Morphogenetic Proteins and Their Gene Expression," in *Cellular and Molecular Biology of Bone*, (Academic Press, Inc.) pp. 131-167, 1993.
- Wrana *et al.*, *Nature* 370:341-347, 1994.
- Wu and Wu, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 12:159-167, 1993.
- Wu and Wu, *Biochem.*, 27:887-892, 1988.
- Wu and Wu, *J. Biol. Chem.*, 262:4429-4432, 1987.
- Xiao *et al.*, *J. Virol.*, 70:8098-8108, 1996.
- Yang *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci USA*, 87:9568-9572, 1990.
- Zambonin *et al.*, "Hydroxyapatite coated with insulin-like growth factor I (IGF1) stimulates human osteoblast activity *in vitro*." *Acta Orthop Scand* 70:217-220, 1999.

#### 【図面の簡単な説明】

以下の図は、本明細書の一部をなし、本発明の特定の局面をさらに明確にするために含まれる。本発明は、ここに示される特定の実施形態の詳細な説明とあわせてこれらの図の一個または複数を参照することにより、より理解され得る。

#### 【図1】

図1は、細胞スフェロイドおよび微小骨片 (microsphercule) の形成ならびに免疫細胞学的分析である。TGF- $\beta$ 1 (200 pM) 存在下で培養した細胞は、スフェロイドを形成し (列1)、微小骨片と命名された結晶骨構造を形成した (列2)。骨細胞スフェロイドはオステオネクチン (列3) およびコラーゲン (マッソン染色、列4) を発現する。また、I型コラーゲンを免疫細胞学的分析により決定した (列5)。骨細胞スフェロイドはまた、アルカリリフォスマターゼ活性を示し (列6)、アリザリンレッド細胞化学陽性により決定される、鉱化を受ける (列7)。MG63 (ヒト骨肉腫細胞系)、HBCP (ヒト骨前駆細胞)、および骨芽細胞 (コラーゲナーゼ処理した骨細胞片由来の初代ヒ

ト骨芽細胞)。

### 【図2】

図2は、骨細胞表現型に依存した微小骨片の形成である。研究した3種の各細胞型当たりの形成された微小骨片の総数。値は平均±標準偏差である。

### 【図3】

図3は、骨細胞スフェロイドおよび微小骨片のTEM分析である。初代骨芽細胞を細胞スフェロイドを形成する条件下で培養した。上段のパネルは微小骨片(MSp)およびMSpに沿った立方形の骨芽細胞の切片を示す。これらの細胞は突き出た核(N)、およびMSpに沿った長い細胞突起を示す(倍率3,000)。より高倍率の微小骨片(中段のパネル)は、MSpに対する骨芽細胞の密接な位置関係を証明する。矢印はMSpに沿った細胞突起を指す(倍率15,900)。核(N)、ミトコンドリア(M)。下段のパネルは、微小骨片(MSp)、鉱化前線(mineralization front, MF)、および40-670オングストロームのコラーゲンの交差帯を示す(倍率15,200)。

### 【図4】

図4A、図4B、図4C、および図4Dは、微小骨片のラマン分析である。微小骨片を誘導した骨細胞スフェロイドを、ラマンスペクトログラフィーによって方法どおりに分析した。代表的骨微小骨片を図4Aに示す。次に骨片を石英のスライドグラス/カバーガラスの間で破碎し、そして、横断する150-300のラマンスペクトルを得た(図4B、白の平行線模様の線)。3個のラマンスペクトルの代表的な試料を図4Cに示す。これらは、明らかに骨の指標である $\nu_1$ (PO<sub>4</sub>)バンド( $959\text{ cm}^{-1}$ )を示す。これらのスペクトル(図4D)の因子分析(本文を参照のこと)は、明らかな $\nu_1$ (PO<sub>4</sub>)シグナルが3日目の微小骨片(上のスペクトル)、および7日目の微小骨片(下のスペクトル)の両方に存在することを示す。

### 【図5】

図5Aおよび図5Bは、骨細胞スフェロイドの骨タンパク質の発現とアルカリフォスファターゼ活性である。骨細胞型は一週間の培養後、無血清(スフェロイ

ド陰性) で、および TGF $\beta$  存在下 (スフェロイド陽性) で培養した。図 5 A。細胞溶解物はオステオネクチンおよびアルカリフォスファターゼに対するウエスタン分析によって分析された。I 型コラーゲンの合成は、 $^3$ H-プロリンでスフェロイドをラベルすることによって決定され、 $\alpha$ 1 (I) 型コラーゲン鎖および $\alpha$ 1 (III) 型コラーゲン鎖は還元電気泳動の遅れによって区別された。図 5 B。アルカリフォスファターゼの酵素活性である。細胞は A と同様に培養され、酵素活性は比色分析で決定された。この結果は、 $\mu\text{mol}$  1 パラニトロフェノール / hr / mg タンパク質で表される。値は、平均値±標準偏差である ( $n=4$ )。

## 【図 6】

図 6 A および図 6 B は、密度依存的な骨タンパク質の発現の誘導である。図 6 A。骨細胞スフェロイドは表示された細胞密度で形成された (MG 63 および骨芽細胞を 1, 2,  $4 \times 10^5$  細胞 / ウェルで、H B P C s は 1, 2,  $4 \times 10^6$  細胞 / ウェルでプレートした)。オステオネクチンの発現はウエスタン分析によって決定された。図 6 B。骨タンパク質の発現はスフェロイドの大きさの増加に応じて増大した。スフェロイドを、その大きさに基づいて (それぞれ約 3, 000, 30, 000、および 100, 000 細胞 / スフェロイド)、小、中、大の大きさの集団に分離した。

## 【図 7】

図 7 A および図 7 B は、骨タンパク質発現の速度論である。図 7 A。骨細胞スフェロイドの形成を、表示された時点で検査した。オステオネクチンおよびアルカリフォスファターゼの発現をウエスタン分析によって決定した。図 7 B。任意の O. D. ユニットで表した相対的なタンパク質の量を、タンパク質負荷のために標準化し、濃度測定によって決定した (MG 63 および H B P C)。初代骨芽細胞について、アルカリフォスファターゼの酵素活性は方法に記載されたように決定した。

## 【図 8】

図 8 は、骨細胞スフェロイドの形成は、 $\alpha$ インテグリン鎖の発現を誘導することを示す。骨細胞スフェロイドの形成を、方法に記載されたように誘導し、コラ

ゲナーゼ／トリプシン処理を使用して分解した後、フローサイトメトリー測定によってインテグリンの発現を評価した（太いグラフ）。コントロール（点線グラフ）は、二次元平面シートとしての、付着した骨細胞の増殖からなる。インテグリンの発現はコントロールの細胞でも、TGF- $\beta$ 1の有無に関わらず、変化なく観察された。

#### 【図9】

図9は、骨細胞スフェロイドおよび骨微小骨片形成の阻害である。骨細胞は、抗 $\alpha$ 2抗体、抗 $\alpha$ 3抗体（H B P C用に）、および／または抗 $\beta$ 1インテグリン抗体の、各々単独または組み合わせでの存在、非存在下で、細胞スフェロイド形成条件で増殖した。コントロールは、アイソタイプ特異的な不適当な抗体からなる。細胞をまた、EGTA（0.5 mM）またはプロマイシン（5  $\mu$ M）存在下で培養した。阻害のパーセントは不適当な抗体でのコントロール、あるいはEGTAもプロマイシンも欠如した対象との比較で決定した。不適当な抗体は、スフェロイド／微小骨片の形成を阻害しない。

#### 【図10】

図10は、TGF- $\beta$ およびIGFは、骨形成中に相乗的に作用することを示す。マウスの培養系を使用し、フォン・コッサ陽性微小骨片を、骨活性サイトカインの存在下で定量化した。TGF- $\beta$ はトランスフォーミング増殖因子 $\beta$ 1、IGFはインスリン様増殖因子である。

【図1】

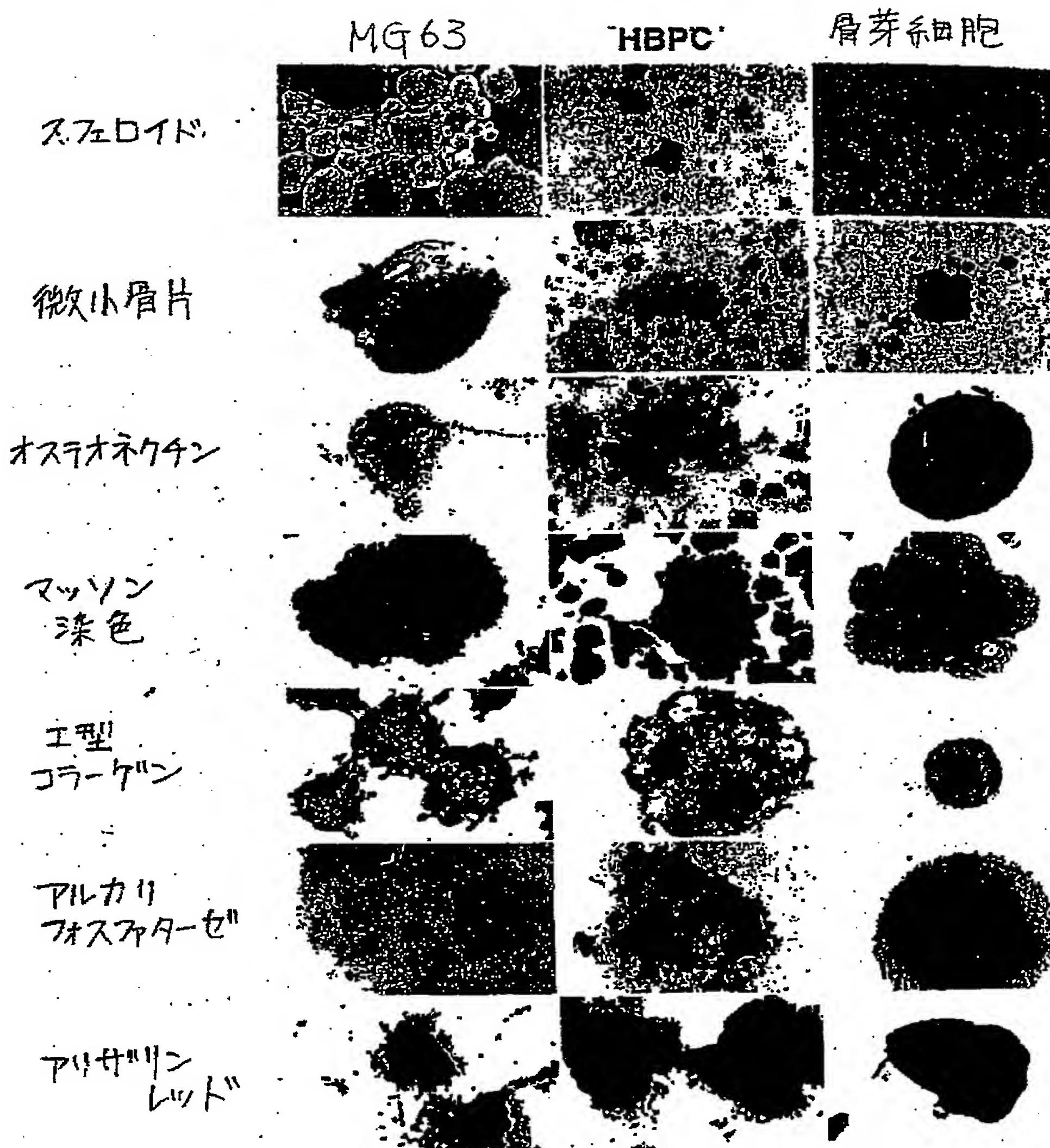


FIG. 1

【図2】

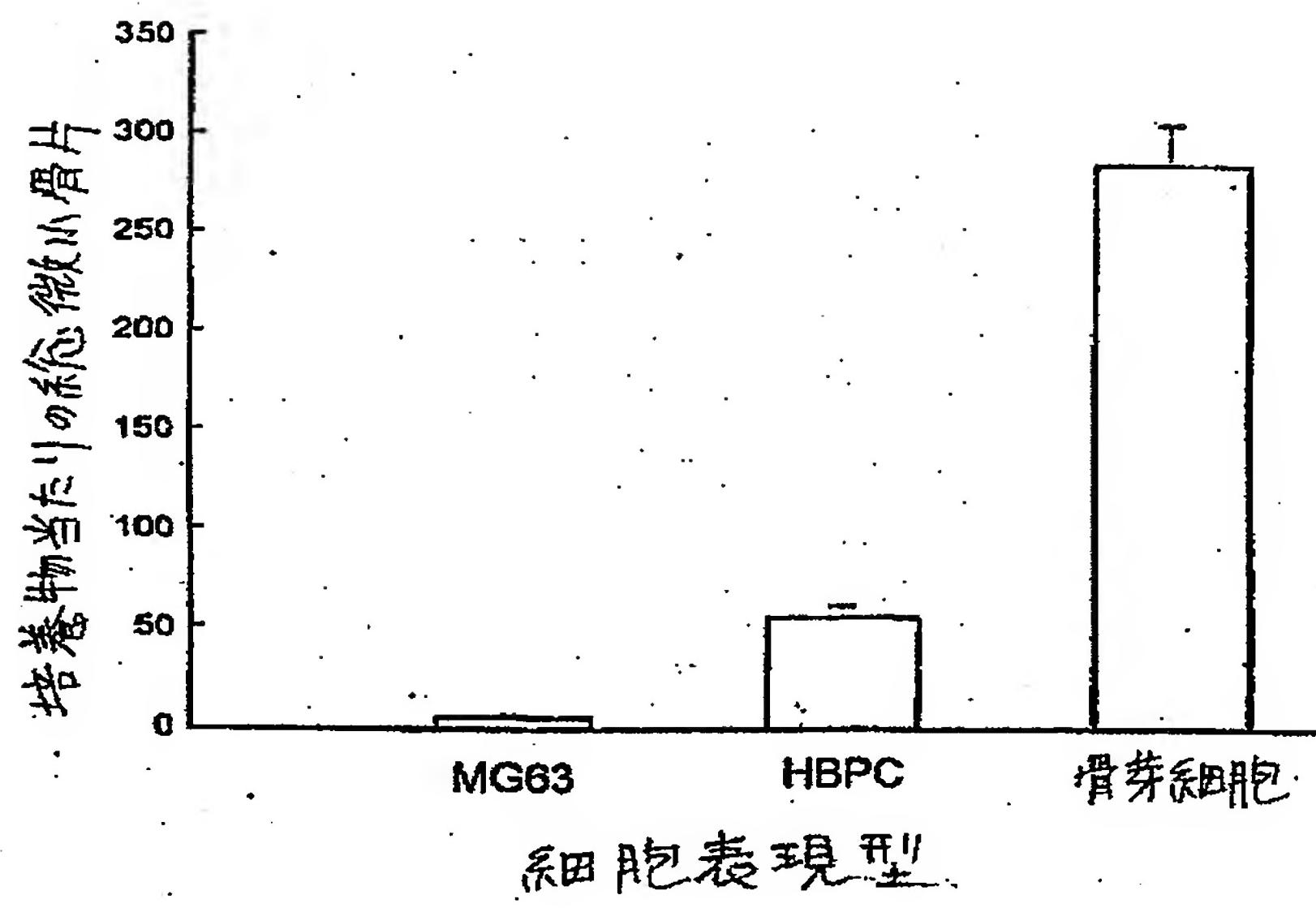


FIG. 2

【図3】

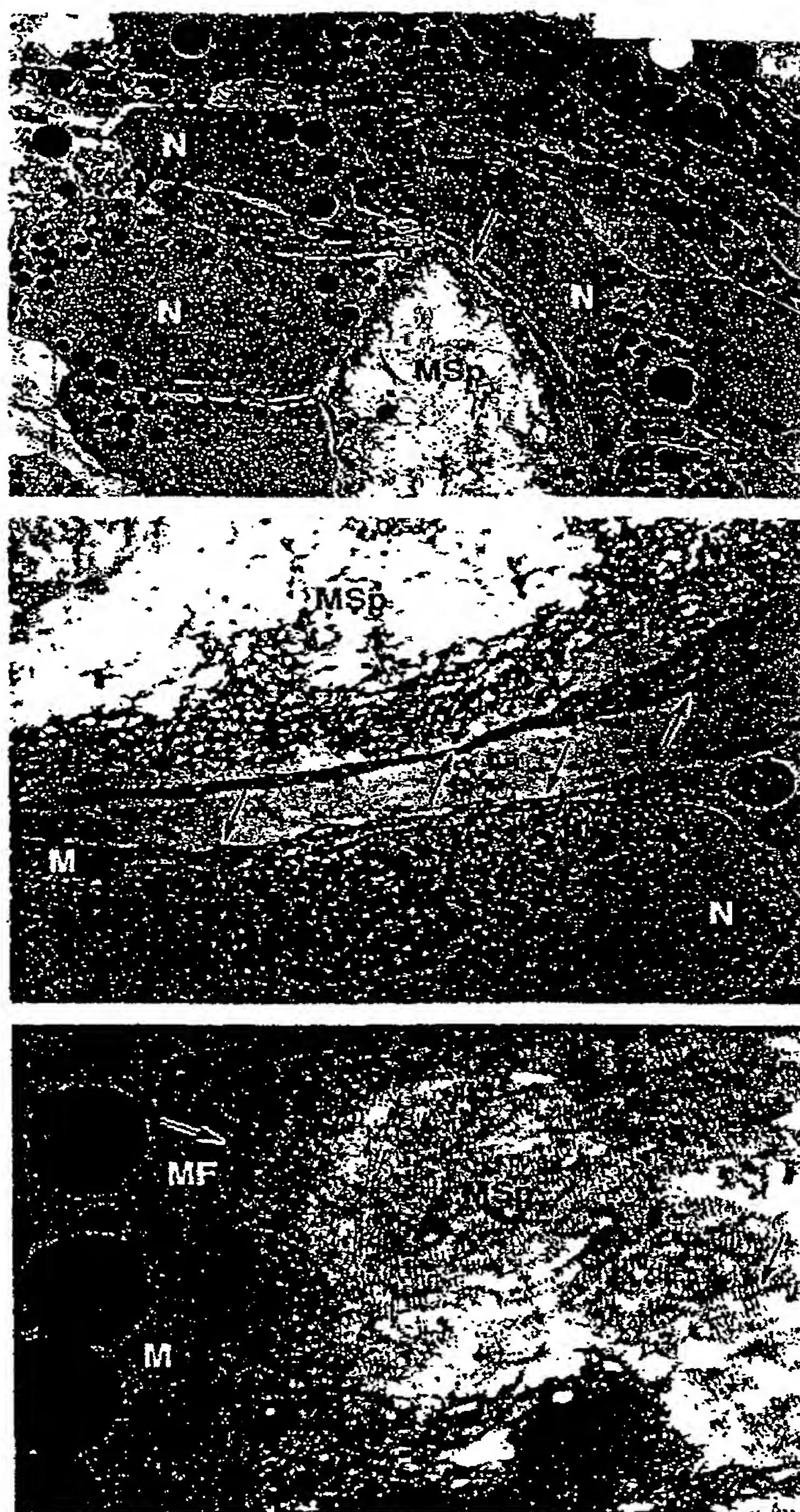


FIG. 3

【図4】

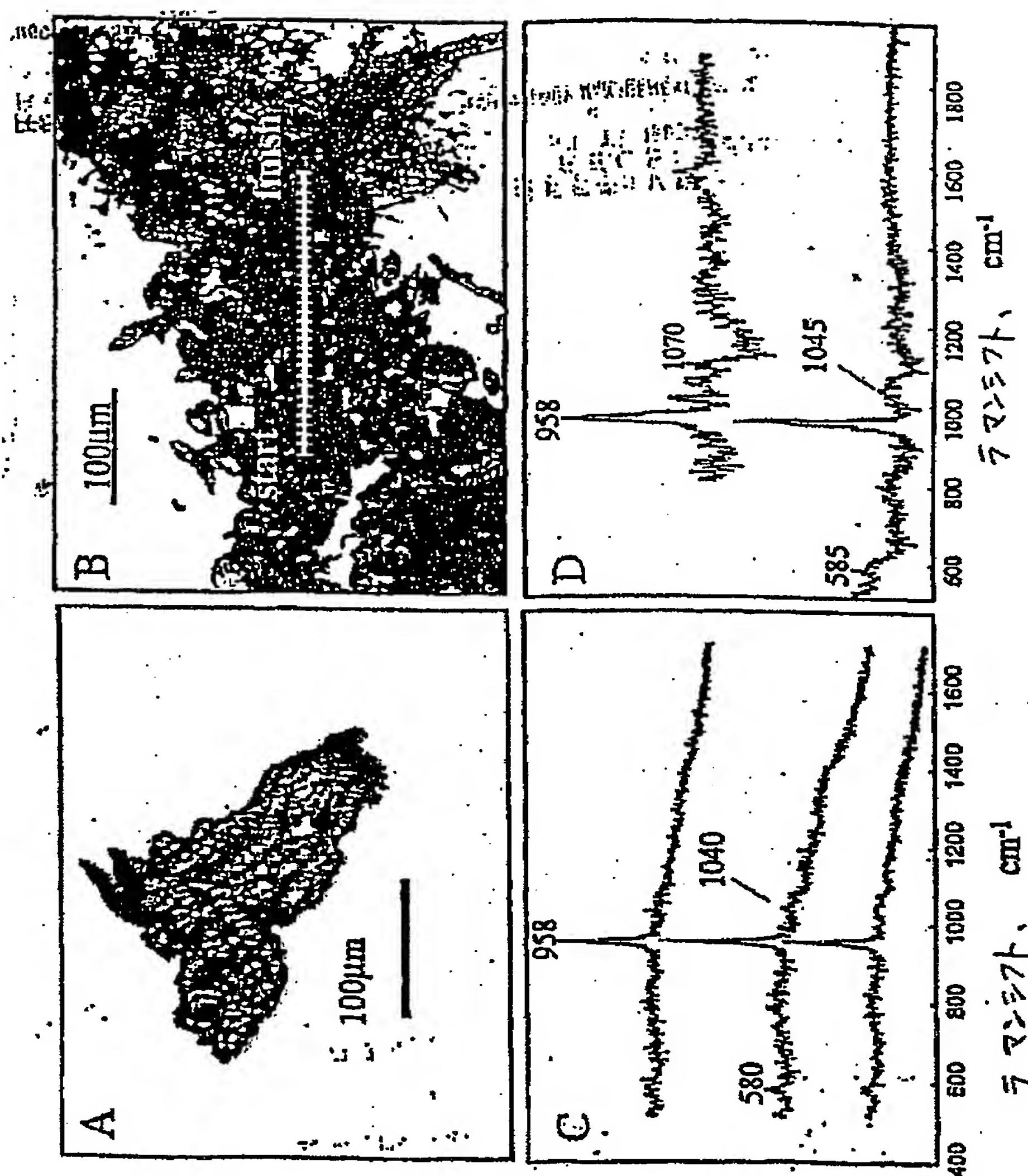


FIG. 4

【図5】

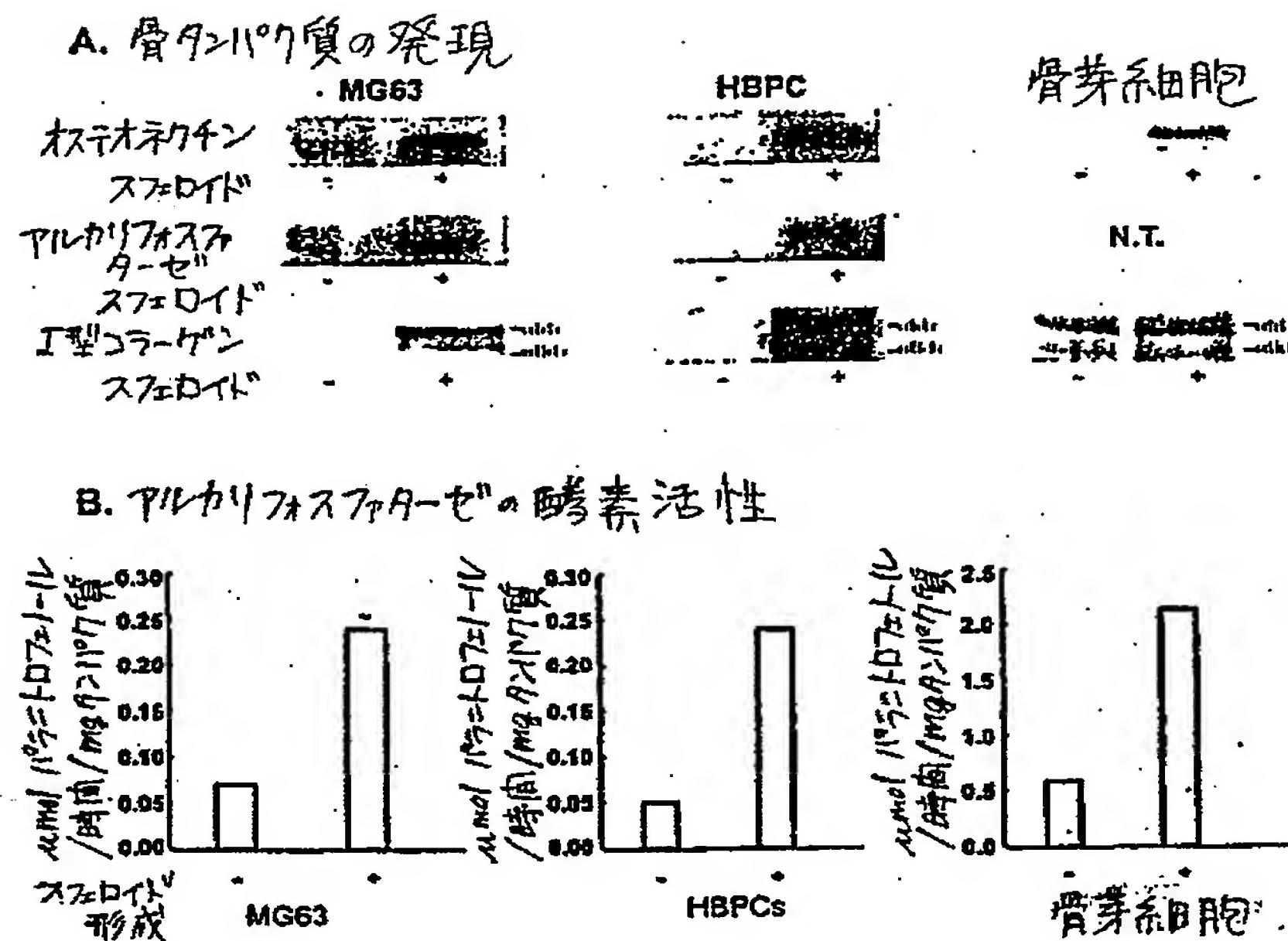


FIG. 5

【図6】

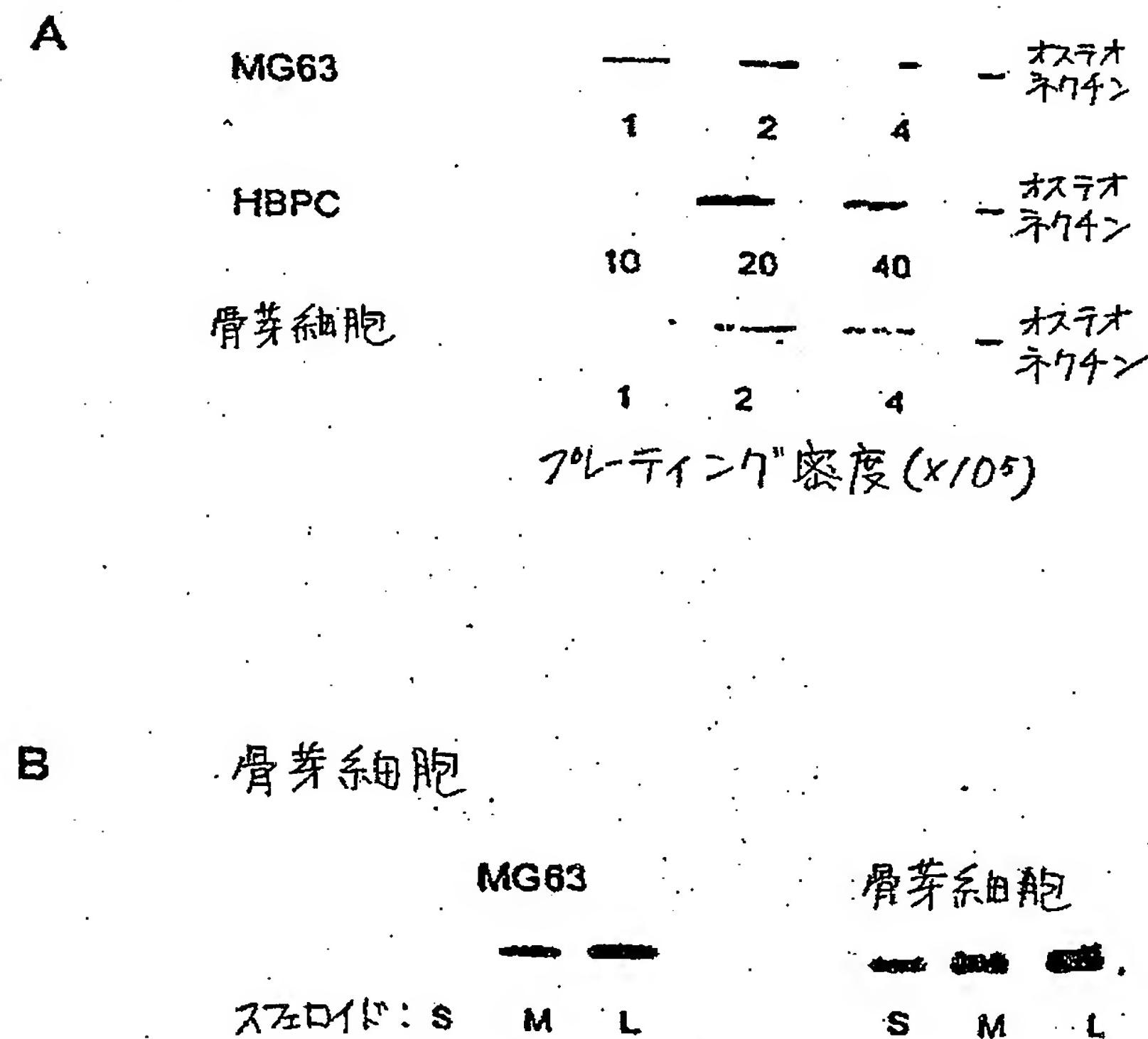


FIG. 6

【図7】

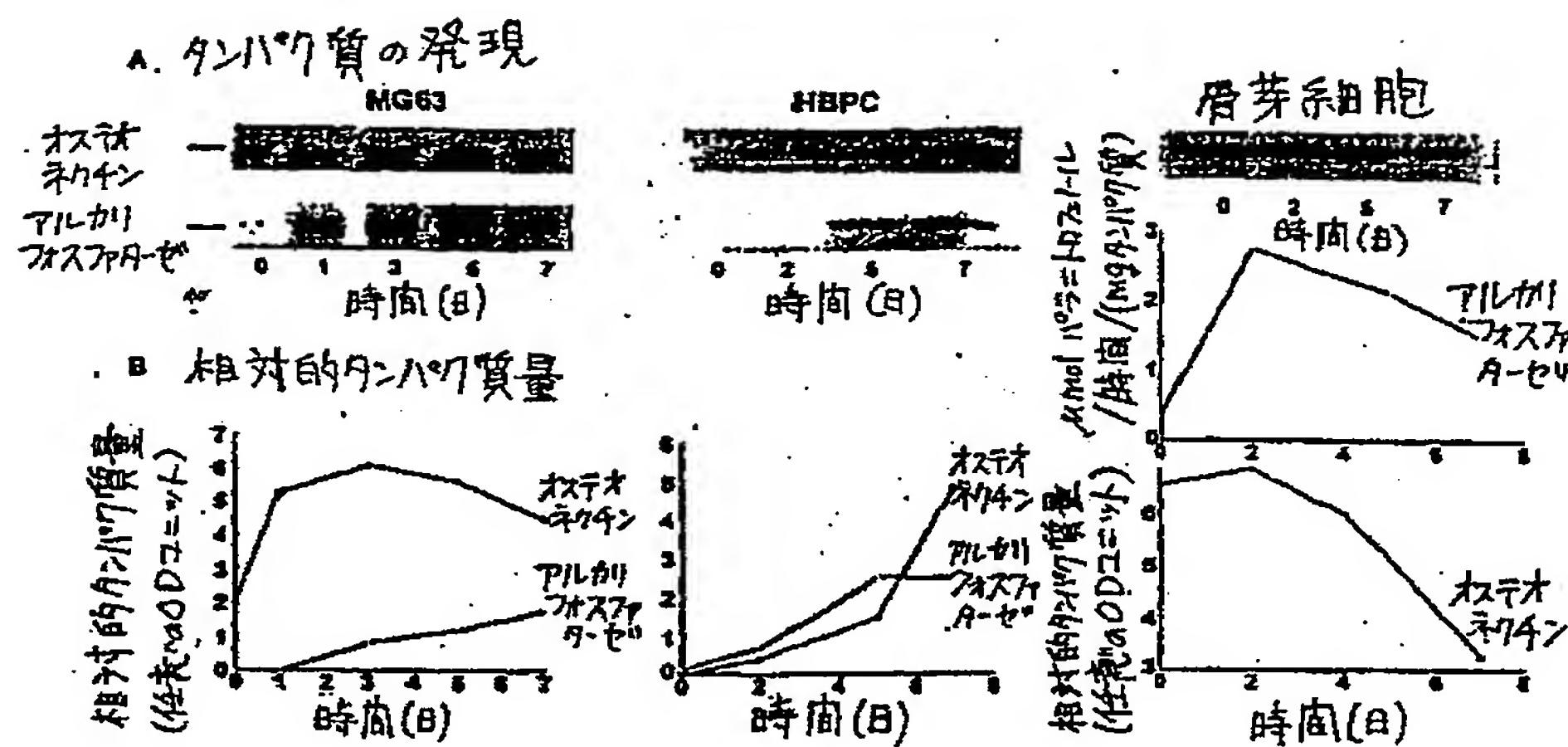


FIG. 7

【図8】

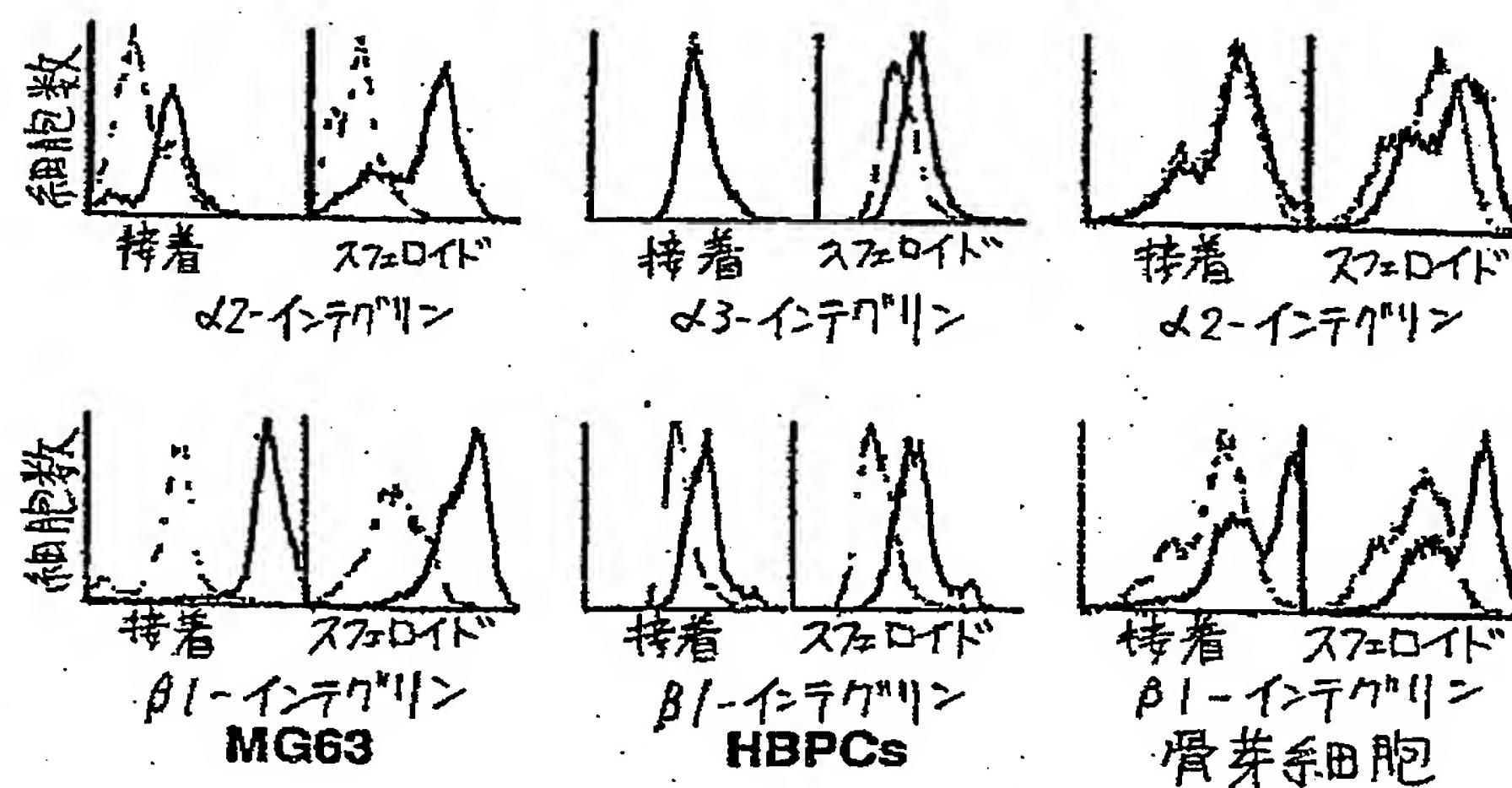


FIG. 8

【図9】

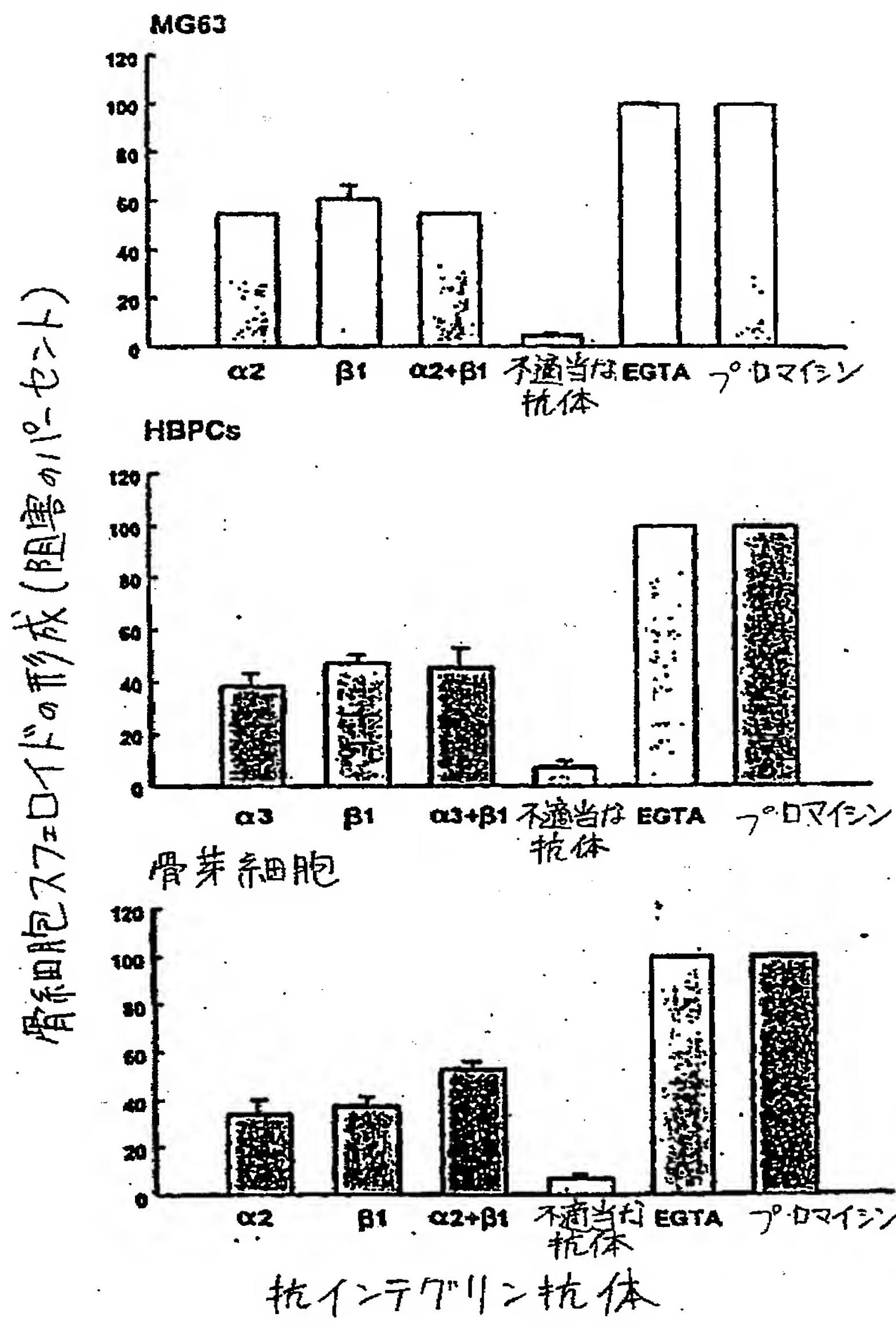


FIG. 9

【図10】

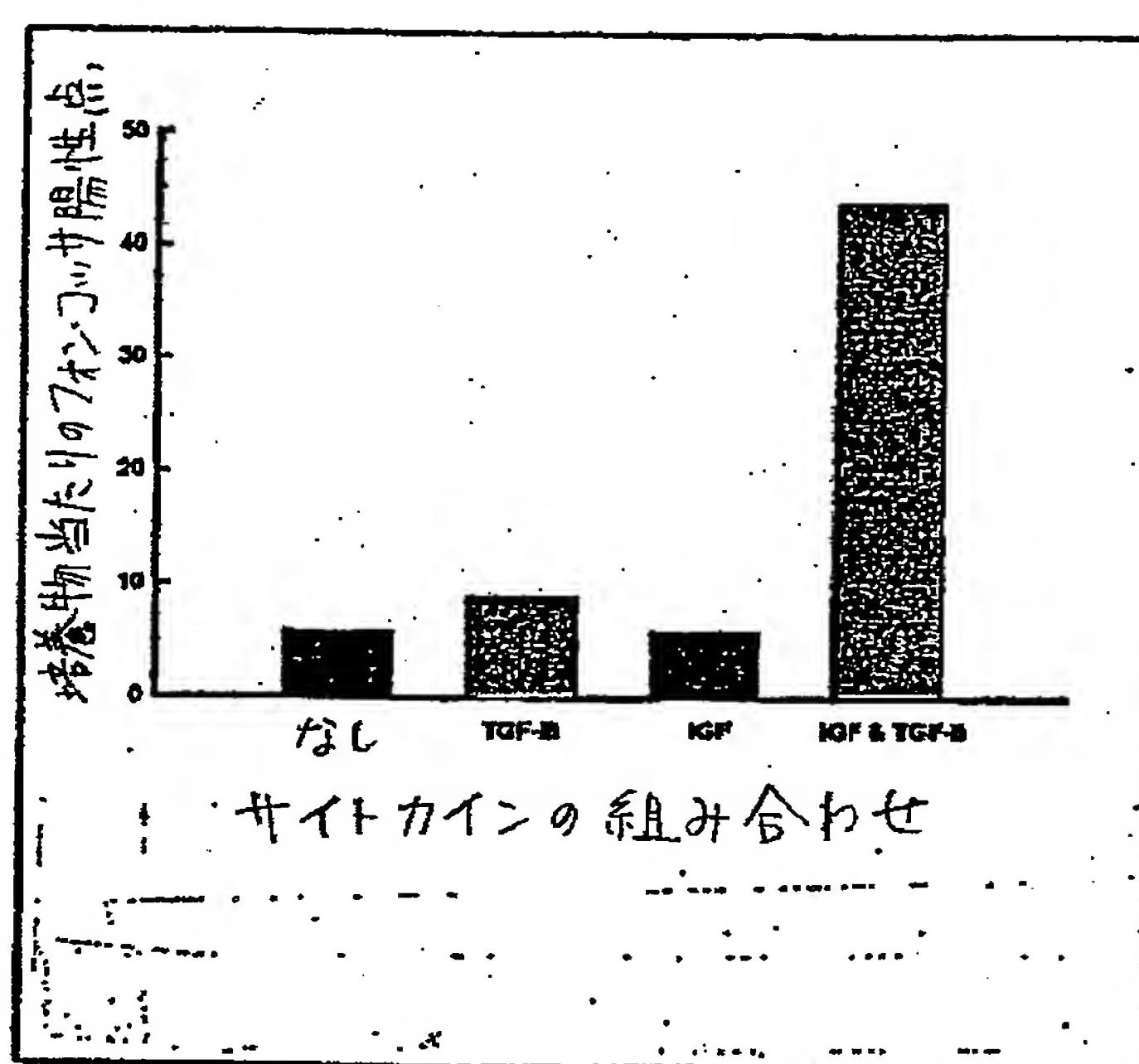


FIG. 10

【手続補正書】

【提出日】平成14年7月9日(2002.7.9)

【手続補正1】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】全図

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図1】

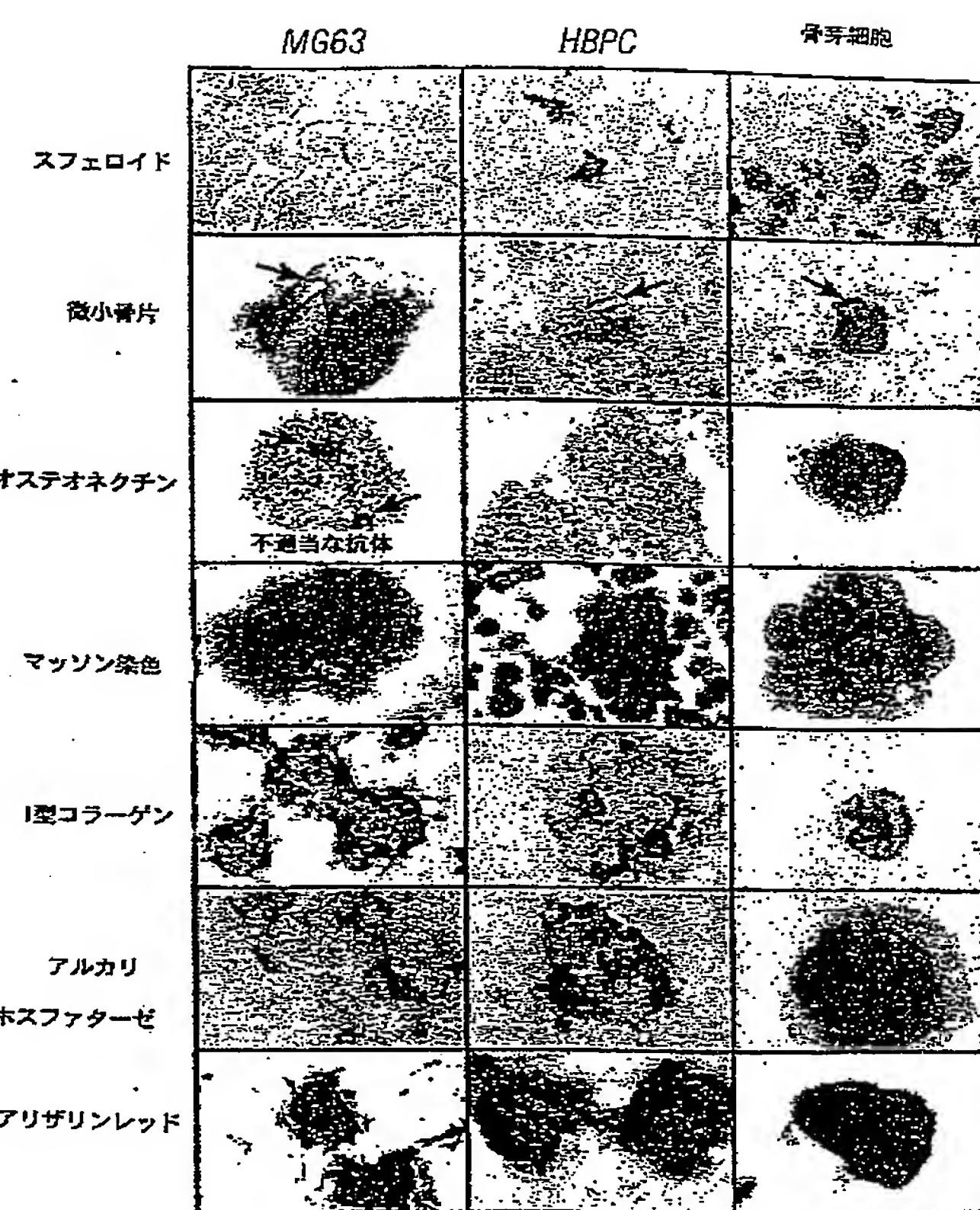


FIG. 1

【図2】

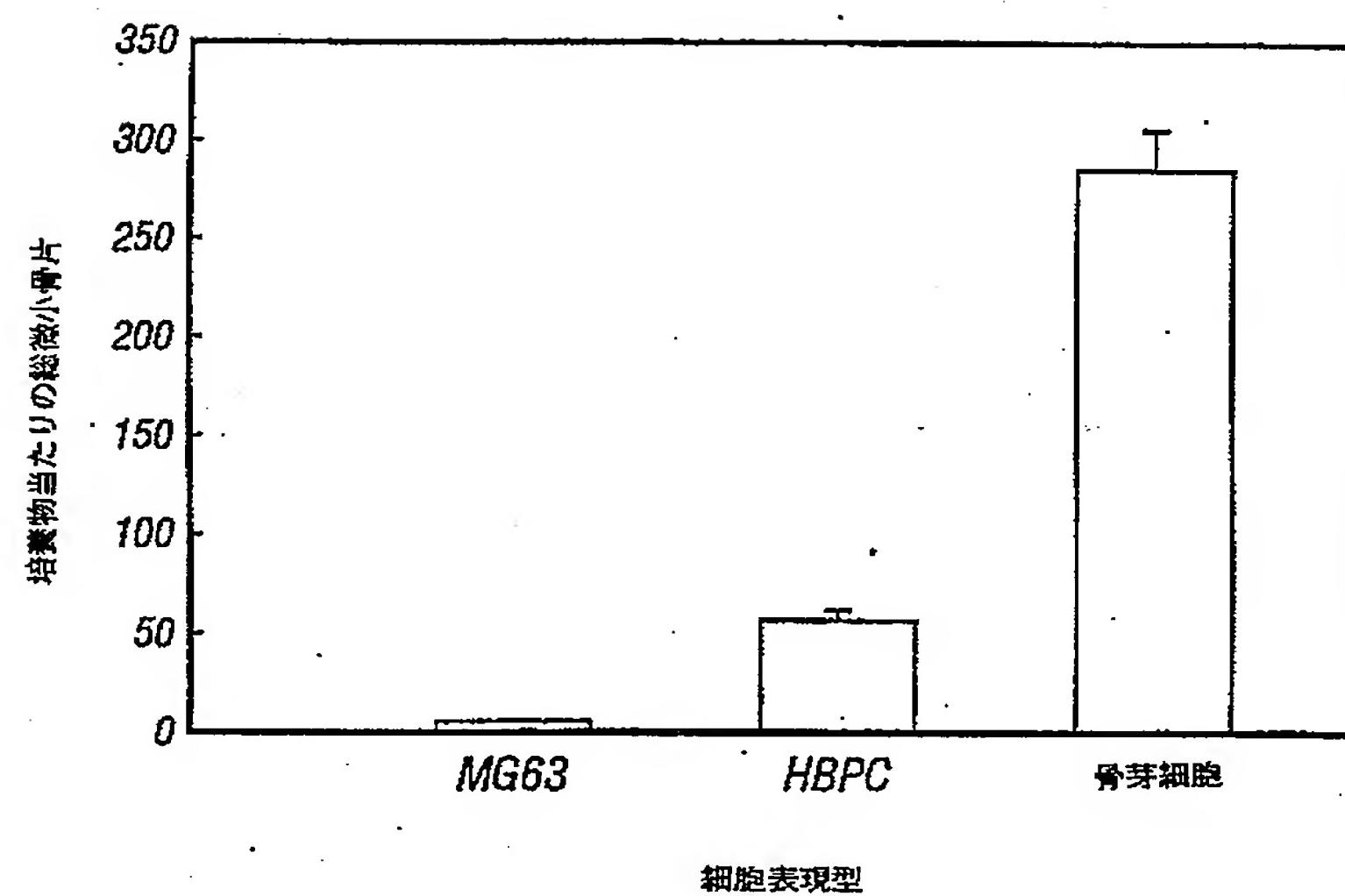


FIG. 2

【図3】

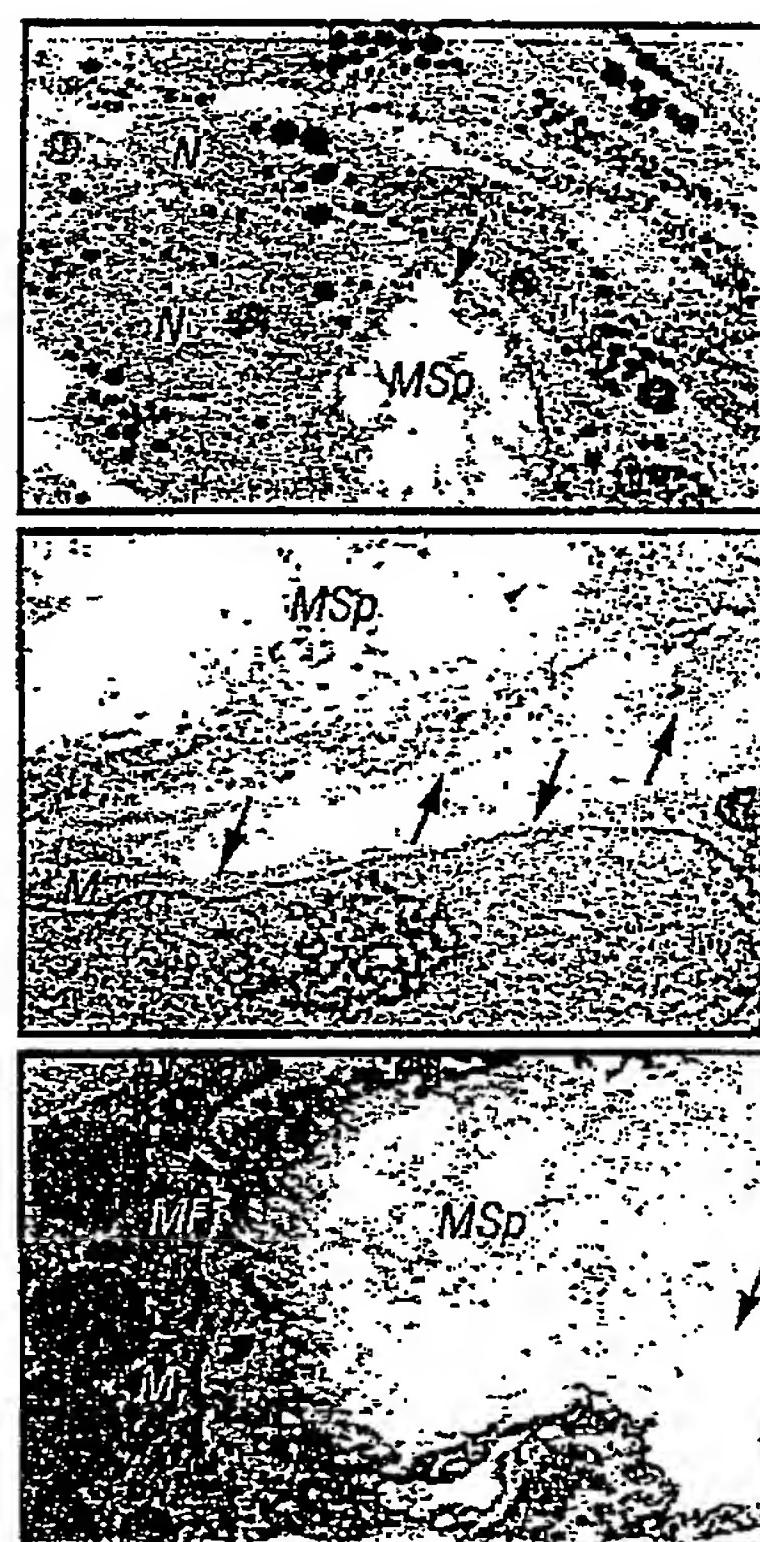


FIG. 3

【図4】

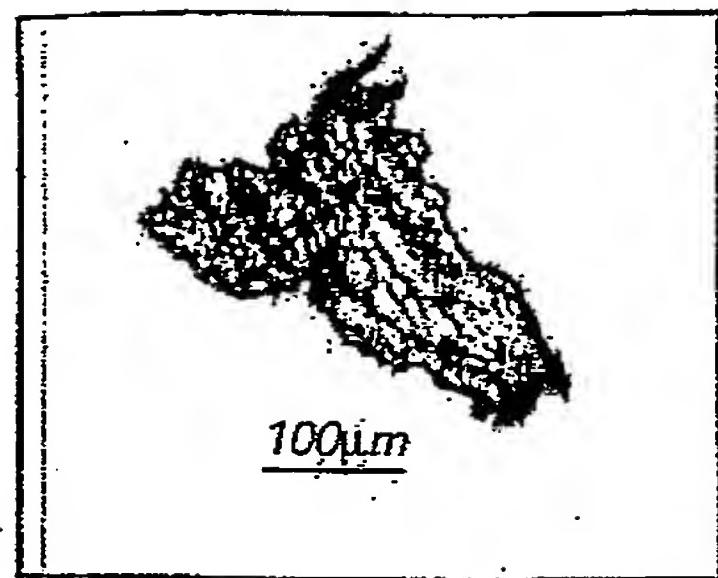


FIG. 4A



FIG. 4B

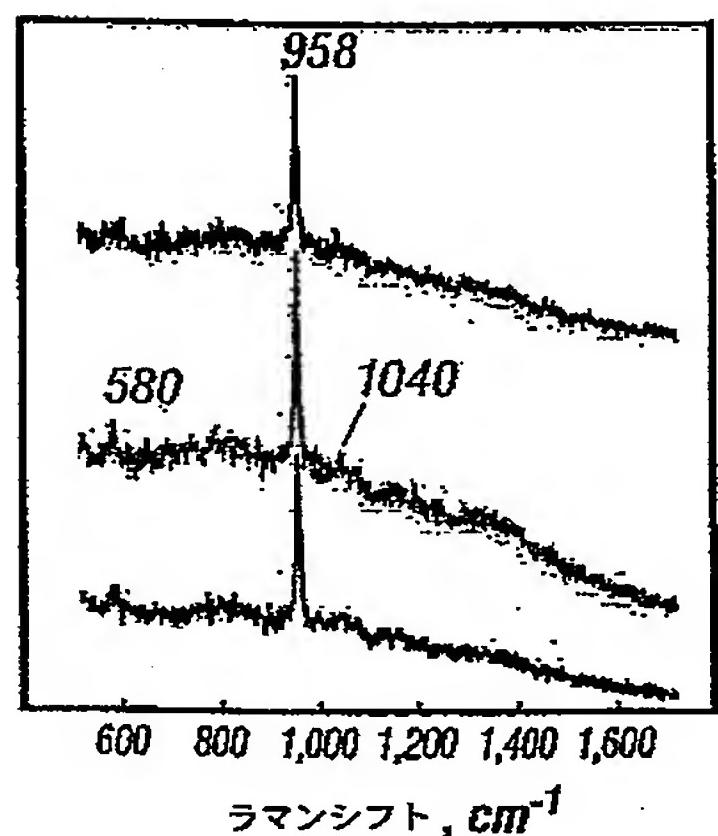


FIG. 4C

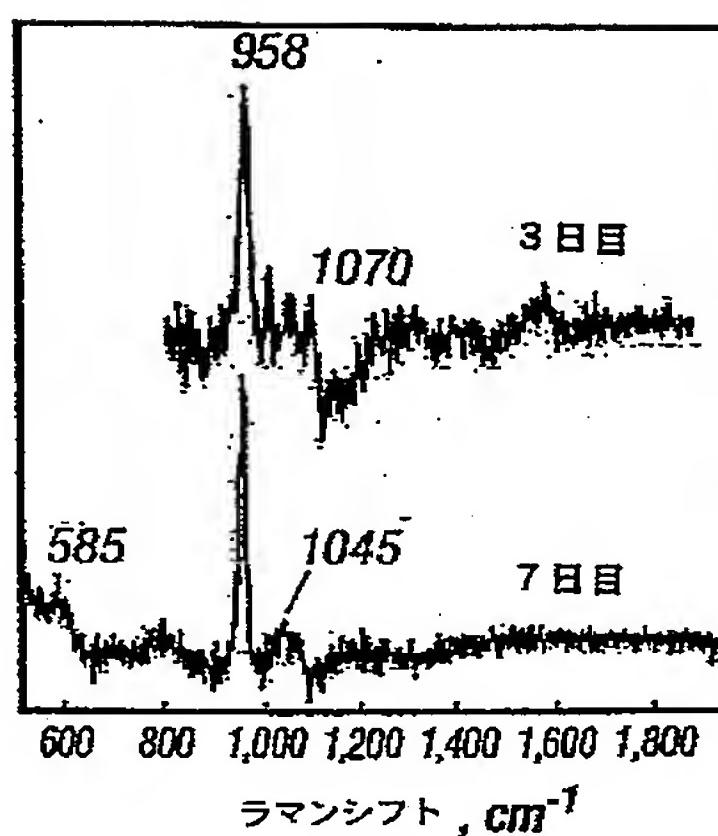


FIG. 4D

【図5】

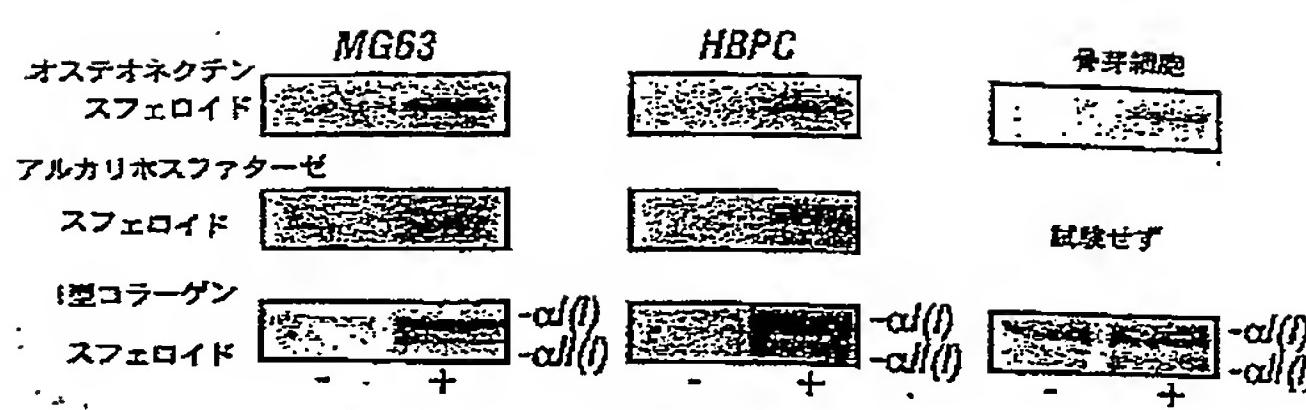


FIG. 5A

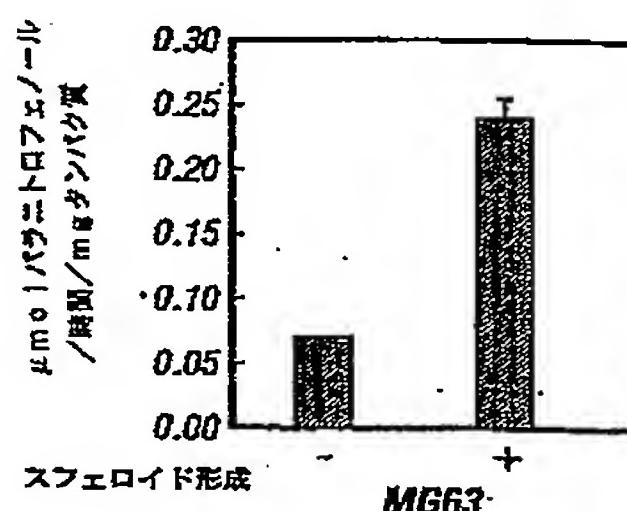


FIG. 5B-1

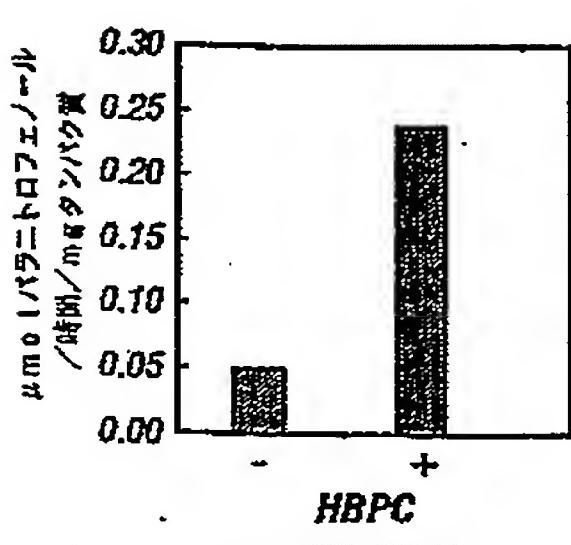


FIG. 5B-2

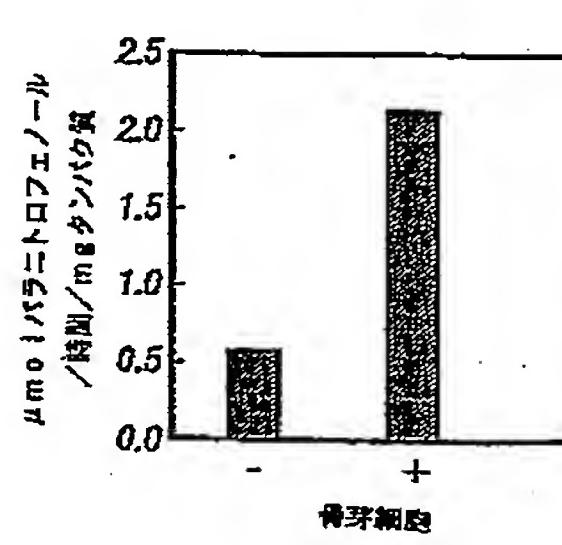


FIG. 5B-3

【図6】

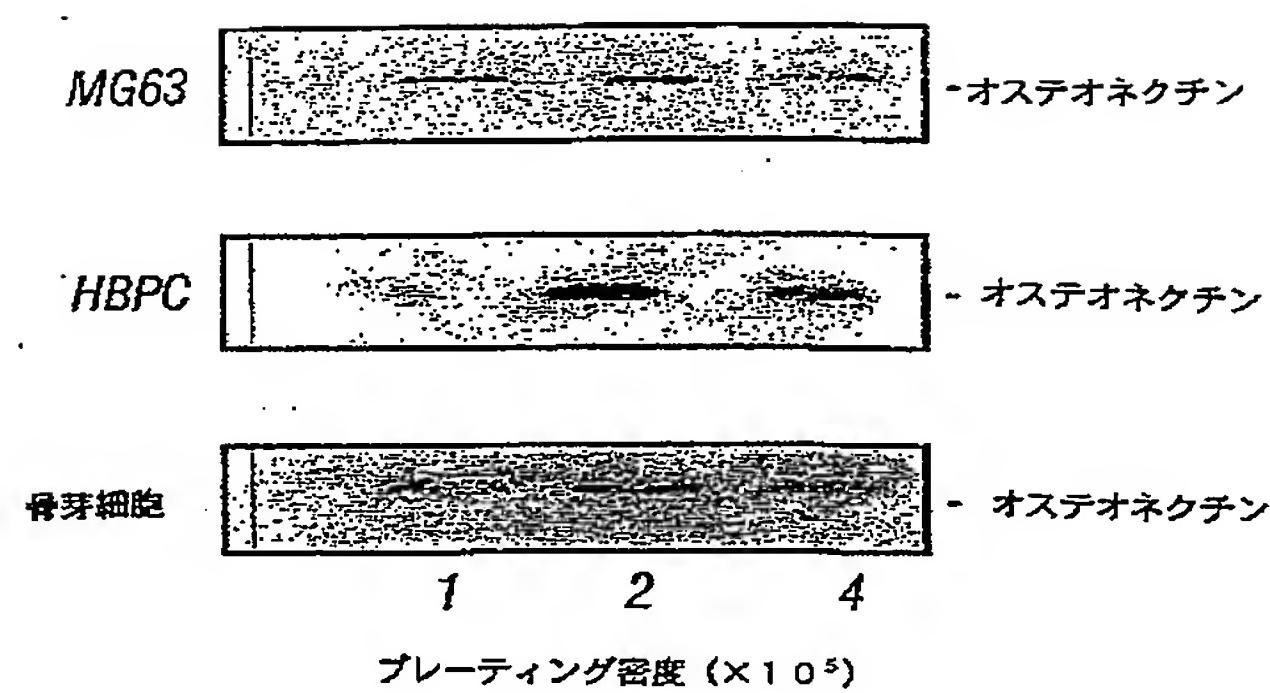


FIG. 6A

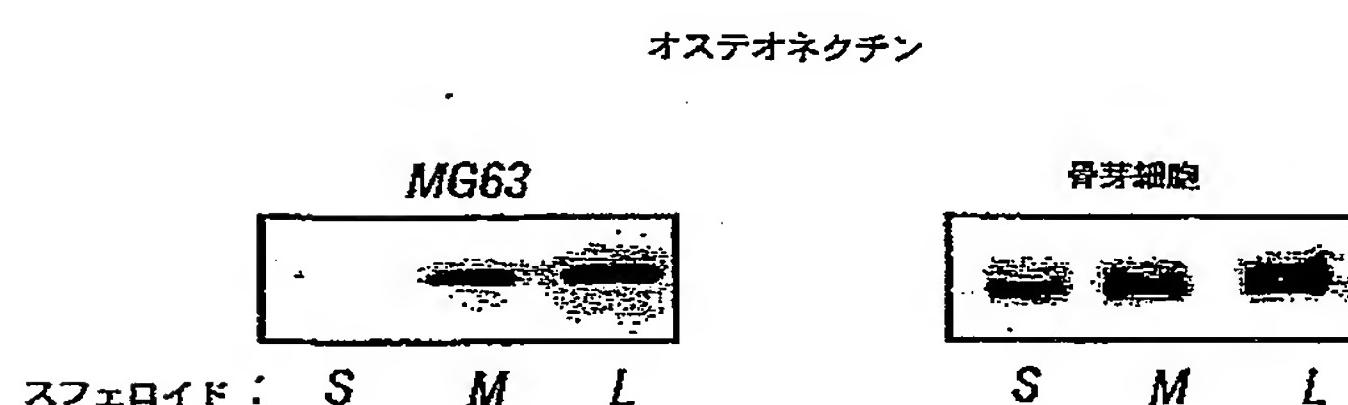


FIG. 6B

【図7】

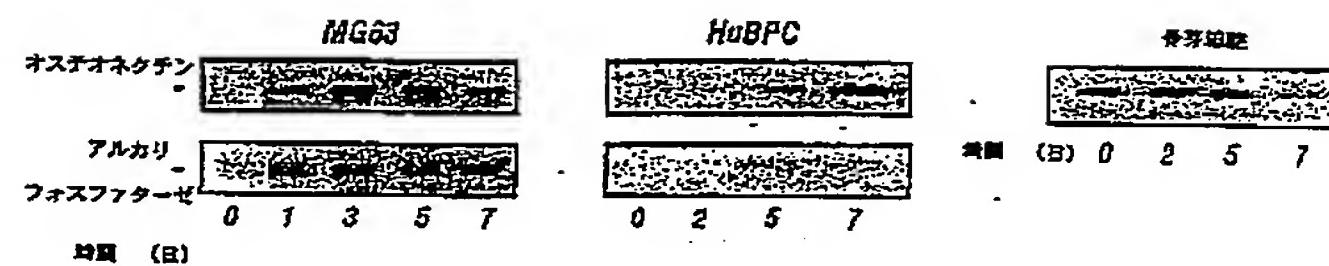


FIG. 7A

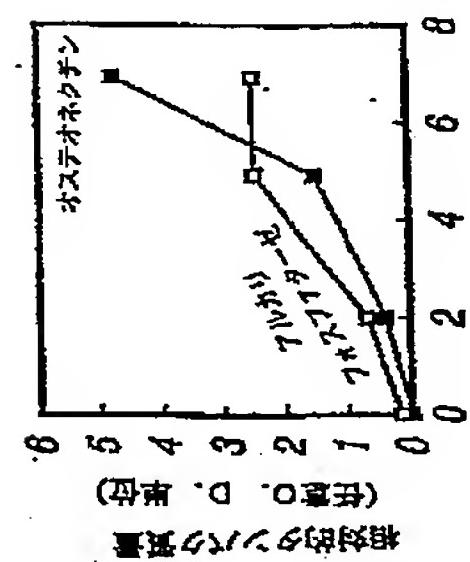


FIG. 7B-2

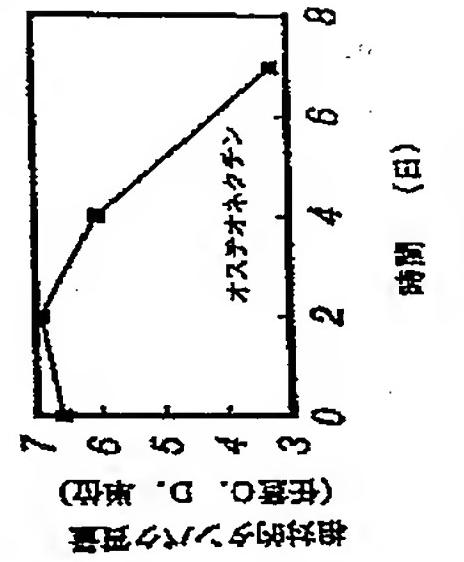


FIG. 7B-4

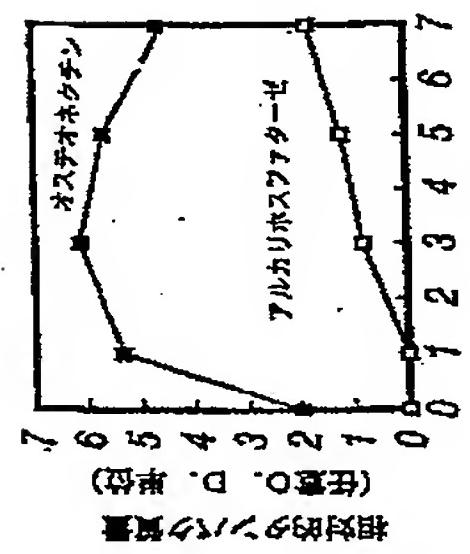


FIG. 7B-1

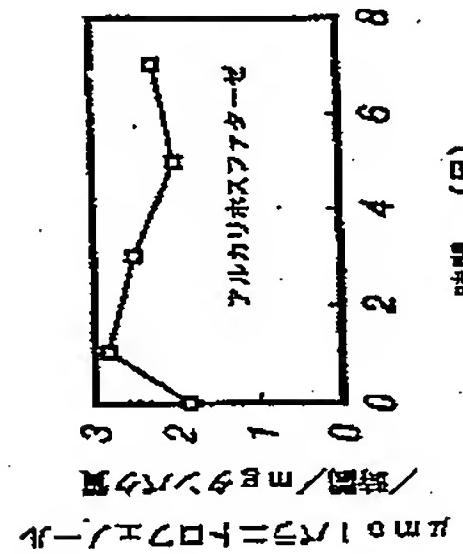
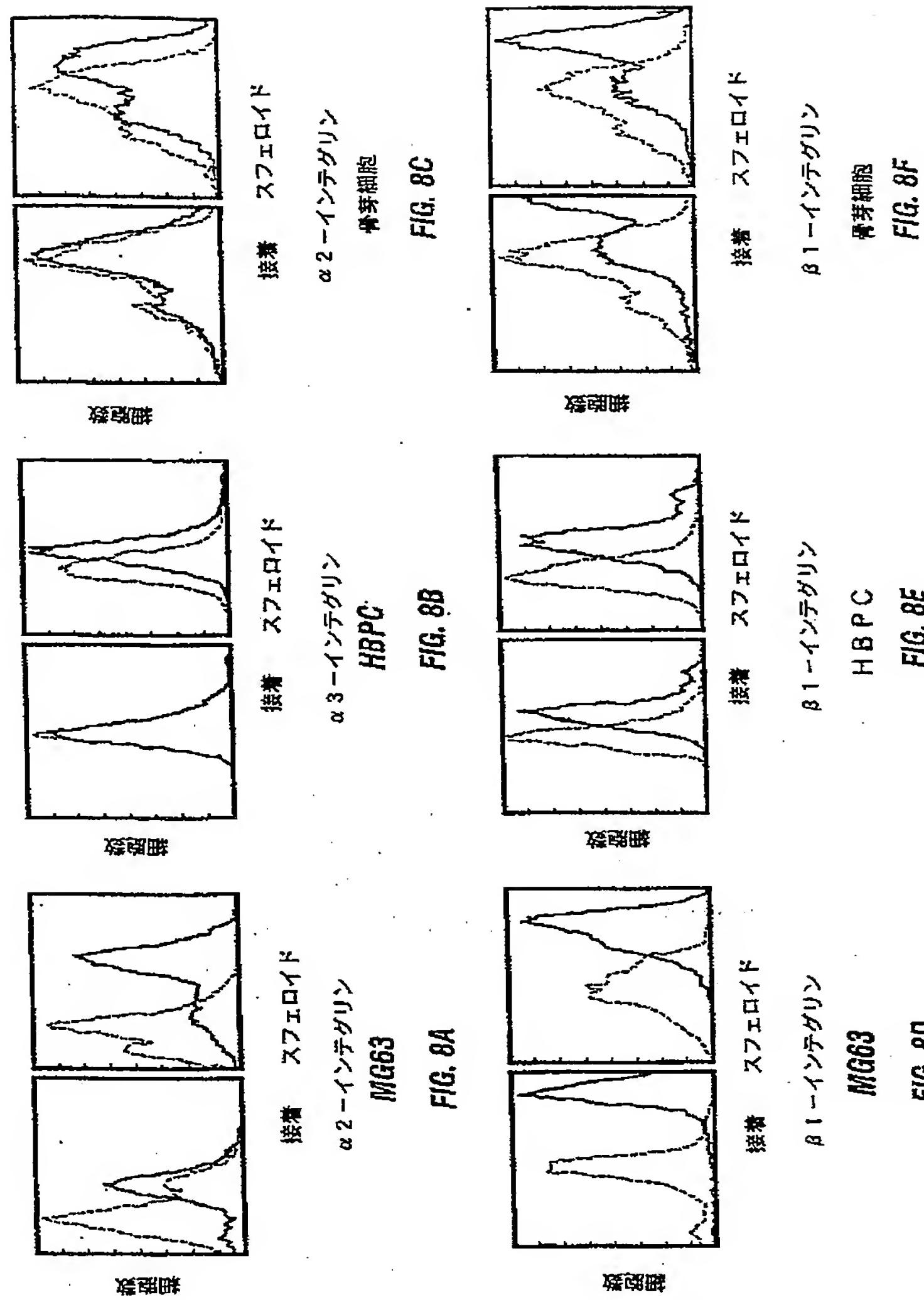


FIG. 7B-3

【図8】



【図9】

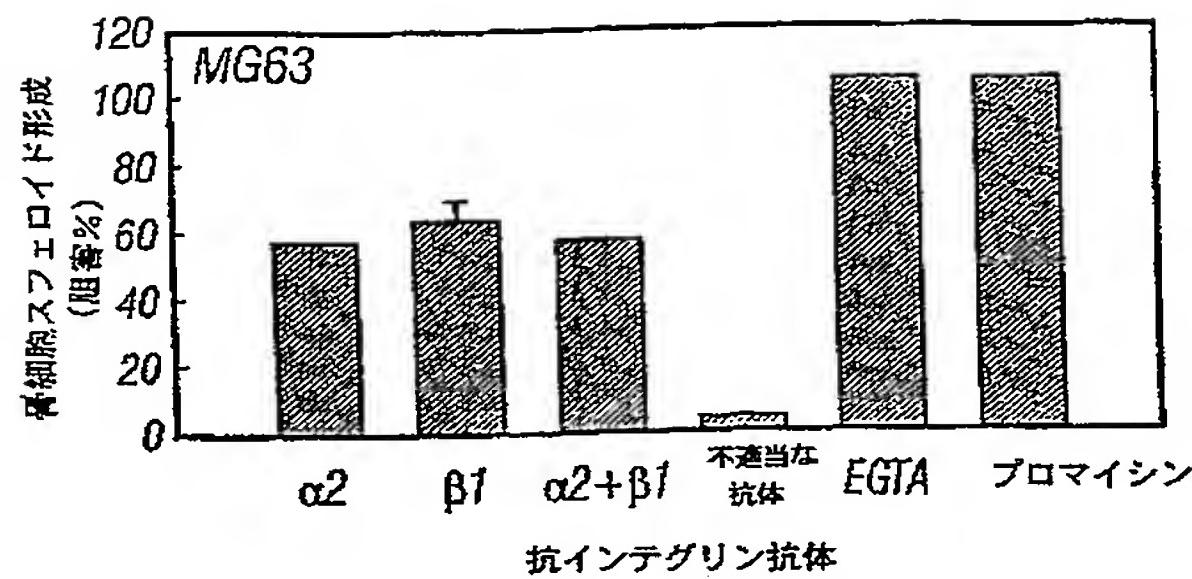


FIG. 9A

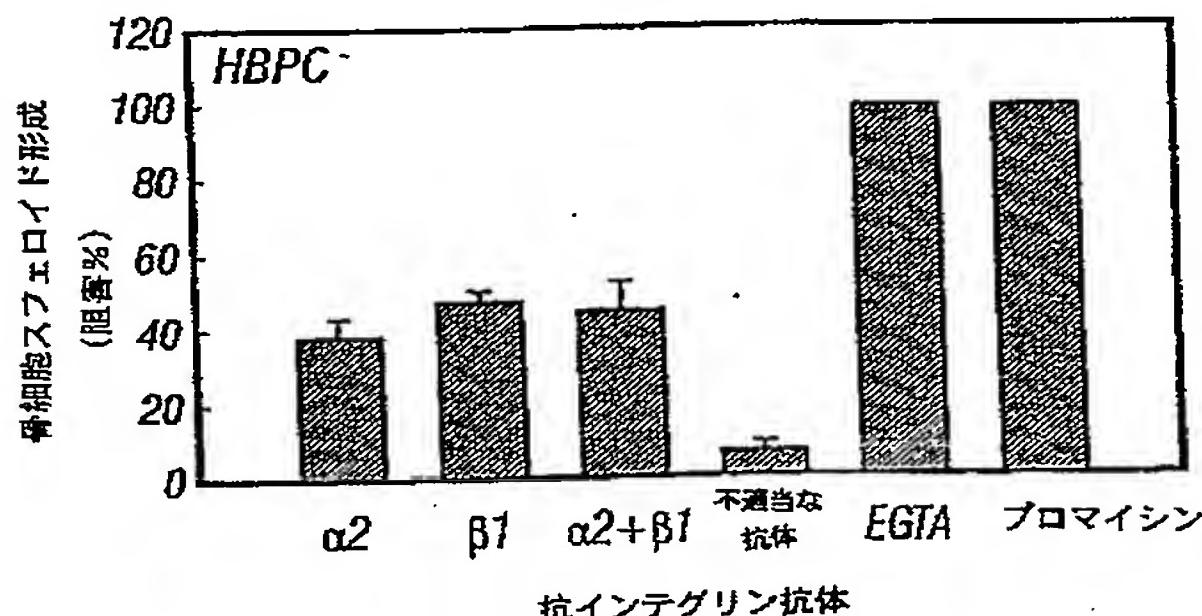


FIG. 9B

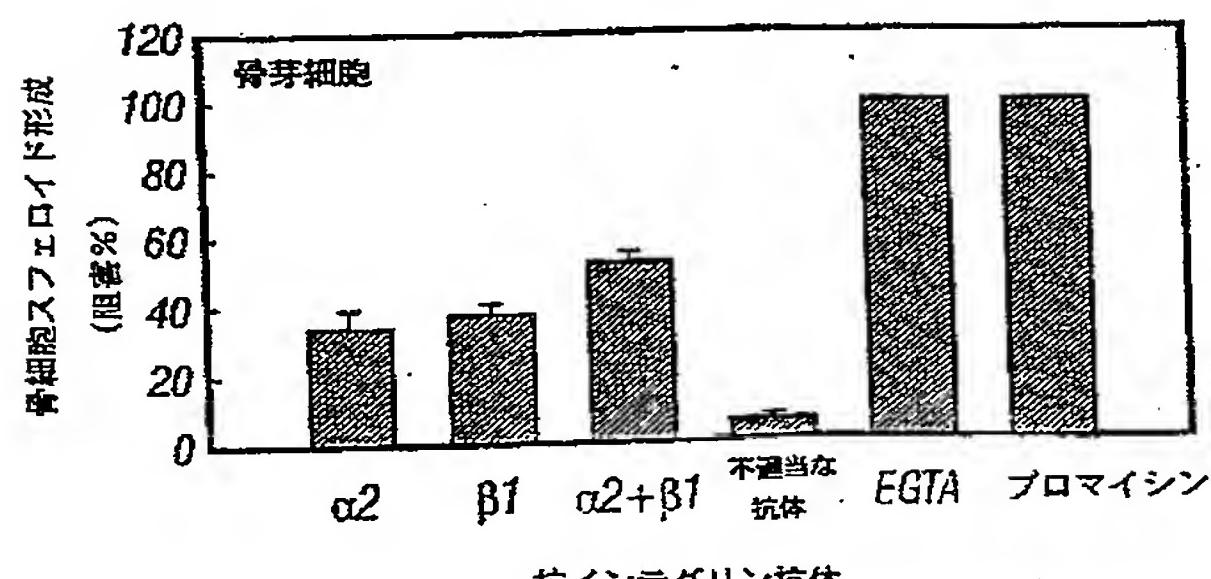


FIG. 9C

【図10】

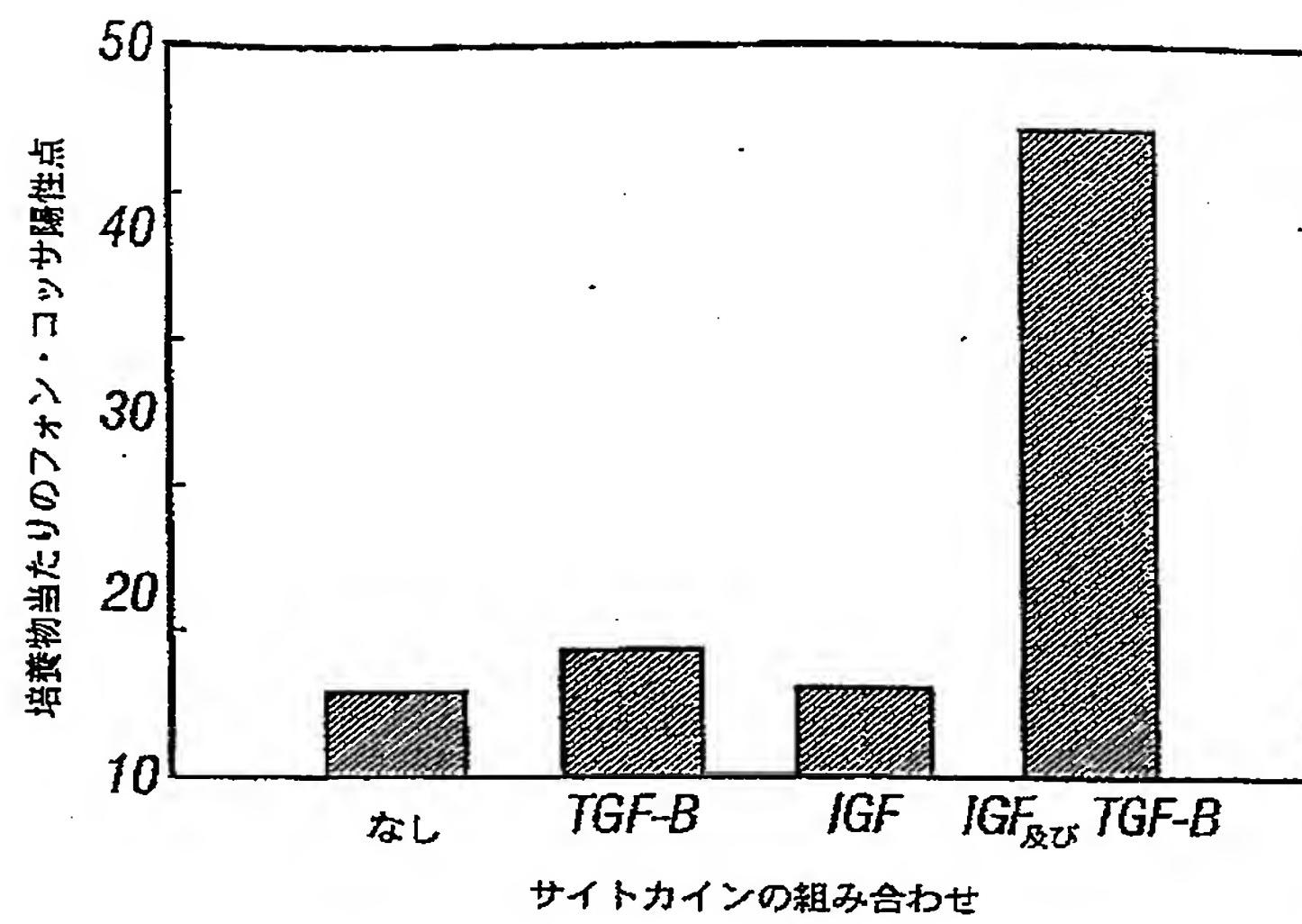


FIG. 10

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT					Int'l Application No PCT/US 00/35720									
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 C12N5/00 C12N5/06 C12N5/08 C12N5/10 A61K35/32 G01N33/50														
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC														
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N G01N														
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched														
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, PAJ, BIOSIS, EMBASE														
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">P, X</td> <td style="padding: 2px;">KALE S. ET AL.: "Three-dimensional cellular development is essential for ex vivo formation of human bone" NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 18, September 2000 (2000-09), pages 954-958, XP000996174 the whole document ---</td> <td style="padding: 2px;">1,2,7, 10,17, 34-38</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">WO 95 05290 A (UNIV MICHIGAN ;LONG MICHAEL W (US); MANN KENNETH G (US)) 22 February 1996 (1996-02-22) page 15, line 18 -page 16, Line 3 page 42, line 19 -page 43, Line 25 page 46, line 31 -page 47, Line 23; figure 4 ---</td> <td style="padding: 2px;">1-29, 35-38 -/-</td> </tr> </tbody> </table>						Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	P, X	KALE S. ET AL.: "Three-dimensional cellular development is essential for ex vivo formation of human bone" NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 18, September 2000 (2000-09), pages 954-958, XP000996174 the whole document ---	1,2,7, 10,17, 34-38	X	WO 95 05290 A (UNIV MICHIGAN ;LONG MICHAEL W (US); MANN KENNETH G (US)) 22 February 1996 (1996-02-22) page 15, line 18 -page 16, Line 3 page 42, line 19 -page 43, Line 25 page 46, line 31 -page 47, Line 23; figure 4 ---	1-29, 35-38 -/-
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
P, X	KALE S. ET AL.: "Three-dimensional cellular development is essential for ex vivo formation of human bone" NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 18, September 2000 (2000-09), pages 954-958, XP000996174 the whole document ---	1,2,7, 10,17, 34-38												
X	WO 95 05290 A (UNIV MICHIGAN ;LONG MICHAEL W (US); MANN KENNETH G (US)) 22 February 1996 (1996-02-22) page 15, line 18 -page 16, Line 3 page 42, line 19 -page 43, Line 25 page 46, line 31 -page 47, Line 23; figure 4 ---	1-29, 35-38 -/-												
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.			<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.											
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed														
*T* later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *V* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *W* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *8* document member of the same patent family														
Date of the actual completion of the international search			Date of mailing of the International search report											
18 May 2001			13/06/2001											
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016			Authorized officer  van Heusden, M											

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Int'l Application No. PCT/US 00/35720
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LONG M W ET AL: "Regulation of human bone marrow-derived osteoprogenitor cells by osteogenic growth factors" JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, NEW YORK, NY, US, vol. 95, 1995, pages 881-887, XP002097648 ISSN: 0021-9738 page 882, right-hand column, paragraph 2 page 883, left-hand column, paragraph 3; figure 2 --- LONG W ET AL: "Expression of human bone related proteins in the hematopoietic microenvironment" JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, NEW YORK, NY, US, vol. 86, 1990, pages 1387-1395, XP002097649 ISSN: 0021-9738 the whole document --- SIGGELKOW H (REPRINT) ET AL: "PROLIFERATION AND DIFFERENTIATION OF HUMAN OSTEOBLAST -LIKE CELL IN CULTURE - AN IN - VITRO MODEL OF OSTEOBLAST DEVELOPMENT" JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH, (AUG 1993) VOL. 8, SUPP. 1, PP. S300. ISSN: 0884-0431., XP000996370 UNIV HOSP GOETTINGEN, D-3400 GOTTINGEN, GERMANY abstract --- EP 0 798 374 A (MATRIX MEDICAL B V) 1 October 1997 (1997-10-01) example I --- P,X WO 00 66178 A (BODEN SCOTT D ; HAIR GREGORY A (US); UNIV EMORY (US)) 9 November 2000 (2000-11-09) the whole document --- P,A WO 00 06150 A (AD FORSCHUNGSSINST ; GERBER ISABEL (CH); SYNERGEN AG (CH); WALLIMANN) 10 February 2000 (2000-02-10) the whole document ---	1-10, 12-17, 38 1-11, 35-38 1, 38 38 31-33 1-38 -/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Int'l Application No PCT/US 00/35720
C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MALAVAL L. ET AL.: "Cellular expression of bone-related proteins during in vitro osteogenesis in rat bone marrow stromal cell cultures" J. CELLULAR PHYSIOLOGY, vol. 158, April 1994 (1994-04), pages 555-572, XP000996387 the whole document -----	1-38
A	HARRIS S.E. ET AL.: "Effects of transforming growth factor beta on bone nodule formation and expression of bone morphogenetic protein 2, osteocalcin, osteopontin, alkaline phosphatase, and type I collagen mRNA in long-term cultures of fetal rat calvarial osteoblasts" J. BONE MIN. RES., vol. 9, no. 6, June 1994 (1994-06), pages 855-863, XP000996371 the whole document -----	1-38
A	YOO J.U. ET AL.: "The chondrogenic potential of bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells" J. BONE JOINT SURG., vol. 80A, no. 12, December 1998 (1998-12), pages 1745-1757, XP000996365 the whole document -----	1-38

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int'l	Local Application No.
PCT/US 00/35720	

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9605290 A	22-02-1996	US 5972703 A		26-10-1999
		AU 712247 B		04-11-1999
		AU 3244295 A		07-03-1996
		CA 2200197 A		22-02-1996
		EP 0804551 A		05-11-1997
EP 0798374 A	01-10-1997	CA 2198978 A		01-09-1997
		US 6152964 A		28-11-2000
WO 0066178 A	09-11-2000	AU 4683100 A		17-11-2000
WO 0006150 A	10-02-2000	NONE		

フロントページの続き

(51) Int.C1. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N	21/78	G 0 1 N	33/53
	33/50		S 4 C 0 8 1
	33/53	33/543	Y
	33/543	33/573	5 7 5
	5 7 5	C 1 2 N	A
	33/573	5/00	E
		15/00	A
(71)出願人	W o l v e r i n e T o w e r, R o om 2071, 3003 S. S t a t e S t r e e t, A n n A r b o r, M I 48109-1280, U. S. A.		
(72)発明者	ロング, マイケル ダブリュー. アメリカ合衆国 ミシガン 48167, ノ ースビル, ハイ ストリート 570		
(72)発明者	ケイル, スジャータ アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02215, ボストン, ケスウィック ス トリート 14, アパートメント ビー2		
F ターム(参考)	2G045 AA24 CB01 CB13 FB03 FB12 GC15 2G054 AA08 CA21 CA28 CE02 EA03 4B024 AA11 CA04 EA04 HA14 4B063 QA19 QQ02 QQ43 QR32 QR55 QS34 4B065 AA90X AA93X BB19 BC46 CA44 4C081 AB02 AB04 AB05 AB06 BA02 BA12 BA16 CA17 CD12 CD17 CD34 CF03		